

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

Diéssica Padilha Dalenogare

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA NOCICEPÇÃO E
NEUROINFLAMAÇÃO OBSERVADA EM MODELOS DE
ESCLEROSE MÚLTIPLA EM CAMUNDONGOS**

Santa Maria, RS
2022

Diéssica Padilha Dalenogare

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA NOCICEPÇÃO E
NEUROINFLAMAÇÃO OBSERVADA EM MODELOS DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, linha de pesquisa Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

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

Santa Maria, RS
2022

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

Dalenogare, Diéssica Padilha
Envolvimento do Receptor TRPA1 na Nocicepção e
Neuroinflamação Observada em Modelos de Esclerose
Múltipla em Camundongos / Diéssica Padilha Dalenogare.-
2022.
147 p.; 30 cm

Orientadora: Gabriela Trevisan dos Santos
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2022

1. Esclerose Múltipla 2. Dor 3. TRPA1 4.
Neuroinflamação 5. Estresse Oxidativo I. Trevisan dos
Santos, Gabriela II. Título.

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

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

Diéssica Padilha Dalenogare

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA NOCICEPÇÃO E
NEUROINFLAMAÇÃO OBSERVADA EM MODELOS DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, linha de pesquisa Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

Aprovada em 3 de maio de 2022

Gabriela Trevisan

**Gabriela Trevisan dos Santos, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)**

Elizabeth Soares Fernandes

**Elizabeth Soares Fernandes, Dr^a
(Faculdades Pequeno Príncipe)**

Maria Fernanda de Paula Werner

Maria Fernanda de Paula Werner, Dr^a (UFPR)

Mauro Schneider Oliveira

Mauro Schneider Oliveira, Dr (UFSM)

Patrícia Severo do Nascimento

Patrícia Severo do Nascimento, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meus passos e me dar força e coragem para seguir em frente.

A minha família, por serem a parte fundamental em minha vida, pois sou eternamente grata por tudo. Ao meu pai, Jorge, por sempre me apoiar na busca por meus objetivos. A minha mãe, Sandra, pelos sacrifícios e amor incondicional, pois é a pessoa a qual eu mais admiro. Aos meus padrinhos Maria Luiza, Antônio, Alexandre e Ana Paula por fazerem parte dos momentos marcantes da minha vida. Muito obrigada por sempre estarem sempre ao meu lado.

A minha orientadora, Gabriela Trevisan, agradeço pelas oportunidades que tive durante esse tempo de doutorado e pelos ensinamentos os quais me ajudaram significativamente em meu crescimento profissional na área da pesquisa.

Aos professores componentes da banca, Elizabeth Soares Fernandes, Maria Fernanda de Paula Werner, Mauro Schneider Oliveira e Patrícia Severo Nascimento agradeço a disponibilidade e as valiosas sugestões para o presente estudo.

Aos meus amigos, as quais tenho uma admiração imensa, agradeço a compreensão e por serem minha rede de apoio. Em especial a Gabriela Meller, Camilla, Sabrina, Karine e Anna Lisa.

A todos professores, colegas e colaboradores que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste projeto.

Enfim, agradeço à Universidade de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia; à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudo.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta tese se tornar realidade, a minha gratidão e respeito. Muito obrigada!

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.” Guimarães Rosa em “Grande Sertão: Veredas”.

RESUMO

ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA NOCICEPÇÃO E NEUROINFLAMAÇÃO OBSERVADA EM MODELOS DE ESCLEROSE MÚLTIPLA EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Diéssica Padilha Dalenogare
ORIENTADORA: Gabriela Trevisan dos Santos

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), sendo a dor neuropática e a dor de cabeça alterações sensoriais relevantes e de difícil manejo nos pacientes. A dor e a neuroinflamação nas diferentes formas clínicas da EM estão relacionadas com o estresse oxidativo e a infiltração de células inflamatórias no SNC. Estes produtos do estresse oxidativo poderiam ativar canais iônicos, como os receptores de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1). O objetivo deste estudo foi identificar o papel do receptor TRPA1 na nocicepção e neuroinflamação observadas em modelos experimentais de EM. Para isso foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 e camundongos com deleção gênica para o TRPA1 (25-30 g). Em ambos os modelos foram administrados o antígeno MOG₃₅₋₅₅ (glicoproteína da mielina de oligodendrócito), e os adjuvantes Quil A e Completo de Freund (ACF) para os modelos de EM recorrente-remitente (EMRR) e EM progressiva (EMP), respectivamente. A nocicepção foi mensurada pelo teste de von Frey (alodinia mecânica, na região da pata e periorbital) e o teste de acetona (alodinia ao frio, na região da pata). Foram realizados os seguintes tratamentos: pregabalina, sumatriptana, olcegepant, antagonistas do TRPA1 (HC-030031 e A-967079), antioxidantes (ácido alfa-lipoico e apocinina) e oligonucleotídeo antisentido para o TRPA1 por via oral ou intratecal. Foram avaliados os níveis de agonistas endógenos do TRPA1 (peróxido de hidrogênio e 4-hidroxinonal) e a atividade da NADPH oxidase e superóxido dismutase (SOD) na medula espinal, gânglio trigeminal e tronco encefálico. Diferentes marcadores de desmielinização, neuroinflamação e a expressão do TRPA1 foram também avaliados através da técnica de expressão gênica para o modelo de EMRR. Por imunistoquímica foram avaliados os marcadores Iba-1, GFAP e OLIG-2 para os dois modelos. Como resultados, no modelo de EMRR, observou-se a presença de alodinia mecânica (pata traseira e região periorbital) e ao frio (pata traseira). A administração de pregabalina, sumatriptana, olgepant, antagonistas do TRPA1, antioxidantes e o oligonucleotídeo antisentido do TRPA1 apresentaram efeito antinociceptivo no modelo EMRR. Foi observado o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio e 4-hidroxinonal, e a atividade da NADPH oxidase na medula espinal e gânglio trigeminal. Houve uma atenuação da nocicepção nos animais com deleção dos canais TRPA1 induzidos aos modelos de EMRR e EMP. A deleção dos canais TRPA1 também foi capaz de atenuar o aumento dos marcadores Iba-1 e GFAP, bem como o OLIG-2 em animais induzidos aos dois modelos. Pela coloração fast blue observou-se uma prevenção nos animais nocautes para o TRPA1. Porém os animais nocautes para o TRPA1 não apresentaram atenuação nos escores clínicos após as duas induções. Portanto, esses resultados mostram o envolvimento do TRPA1 nos comportamentos de nocicepção e neuroinflamação nos dois modelos de EM.

Palavras-chave: MOG₃₅₋₅₅; estresse oxidativo; HC-030031; peróxido de hidrogênio; 4-hidroxinonal; NADPH oxidase.

ABSTRACT

ROLE OF TRPA1 IN NOCICEPTION AND NEUROINFLAMMATION CAUSED BY MULTIPLE SCLEROSIS MOUSE MODELS.

AUTHOR: Diéssica Padilha Dalenogare
ADVISOR: Gabriela Trevisan dos Santos

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease of the central nervous system (CNS), and neuropathic pain and headache are significant sensory alterations that are difficult to manage in these patients. In the different clinical forms of MS, pain and neuroinflammation are related to oxidative stress and the infiltration of inflammatory cells in the CNS. These oxidative stress products could activate ion channels, such as transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1). This study aimed to identify the role of the TRPA1 receptor in the nociception and neuroinflammation observed in experimental rodent models of MS. C57BL/6 female mice and mice with TRPA1 gene deletion were used (25-30 g). In both models, the antigen MOG₃₅₋₅₅ (oligodendrocyte myelin glycoprotein) and the adjuvants Quil A and Complete Freund's Adjuvant (CFA) were administered for the relapsing-remitting MS (RRMS) and progressive MS (PMS) models, respectively. Nociception was measured by the von Frey test (mechanical allodynia in the paw and periorbital region) and the acetone test (cold allodynia in the paw region). The following treatments were performed: pregabalin, sumatriptan, olcegepant, TRPA1 antagonists (HC-030031 and A-967079), antioxidants (alfa-lipoic acid and apocynin), and TRPA1 antisense oligonucleotide by intragastrical or intrathecal route. The levels of endogenous TRPA1 agonists (hydrogen peroxide and 4-hydroxynonenal), and NADPH oxidase and superoxide dismutase (SOD) activity were evaluated in the spinal cord, trigeminal ganglion, and brainstem samples. Different markers of demyelination, neuroinflammation, and TRPA1 expression were also evaluated using the RNA expression technique for the EMRR mouse model. Immunohistochemistry was performed evaluating the Iba-1, GFAP, and OLIG-2 markers for the two MS models. Firstly, the induced mice to RRMS mouse model developed mechanical (hind paw and periorbital region) and cold (hind paw) allodynia. After, the administration of pregabalin, sumatriptan, olgepant, TRPA1 antagonists, antioxidants and the TRPA1 antisense oligonucleotide showed an antinociceptive effect in the EMRR mouse model. The levels of hydrogen peroxide and 4-hydroxynonenal and NADPH oxidase activity were increased in the spinal cord and trigeminal ganglion samples of RRMS induced mice. The deletion of TRPA1 channels attenuated the development of nociception in the EMRR and EMP induced mice. Genetic deletion of TRPA1 channels was also able to attenuate the increase in Iba-1 GFAP and OLIG-2 markers in the induced animals in both MS models. By Fastblue staining the TRPA1 deletion might prevent the demyelinating process. However, the TRPA1 knockout animals showed no attenuation in clinical scores after the two MS inductions. These results show the involvement of TRPA1 in nociception and neuroinflammation behaviors in these two MS models.

Keywords: MOG₃₅₋₅₅; oxidative stress; HC-030031; hydrogen peroxide; 4-hydroxynonenal; NADPH oxidase.

LISTA DE SIGLAS

4-HNE	4- hidroxinonenal
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
AMP	Alodinia Mecânica Periorbital
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da calcitonina do inglês <i>Calcitonin Gene Related Peptide</i>
EM	Esclerose Múltipla
EMRR	Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente
EMP	Esclerose Múltipla Progressiva
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EAE-RR	Encefalomielite Autoimune Experimental Recorrente-Remitente
EAE-EMP	Encefalomielite Autoimune Experimental Progressiva
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida do inglês Glial do inglês <i>Fibrillary Acidic Protein</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IASP	Associação Internacional para o Estuda da Dor do inglês <i>International Association for the Study of Pain</i>
Iba-1	Molécula Adaptadora Ligante de cálcio ionizado-1 do inglês <i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
OLIG-2	Fator de Transcrição de Oligodendrócitos 2
Quil A	Mix de Saponinas de <i>Quillaja sp.</i>
TRPs	Receptores de Potencial Transitório do inglês do inglês <i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1 do inglês <i>Transient Receptor Potential Ankyrin 1</i>
SNC	Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Vias de sinalização ascendentes e descendentes relacionados à transmissão de estímulos solorosos.....	22
FIGURA 2 – Representação estrutural da estrutura das diferentes famílias de receptores TRPs.....	30
FIGURA 3 – Estrutura do receptor TRPA1.....	33
FIGURA 5 – Figura de conclusão	116

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	ESCLEROSE MÚLTIPLA	15
2.2	DOR.....	18
2.3	DOR NA ESCLEROSE MÚLTIPLA	24
2.4	RECEPTOR TRPA1	30
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4	ARTIGOS	42
4.1	ARTIGO 1	43
4.2	ARTIGO 2.....	58
4.3	MANUSCRITO 1.....	70
5	DISCUSSÃO	100
6	CONCLUSÃO	115
7	PERSPECTIVAS	117
	REFERÊNCIAS	118
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSM REFERENTE AOS TESTES UTILIZADOS NO ARTIGO 1	143
	ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSM REFERENTE AOS TESTES UTILIZADOS NO ARTIGO 2	144
	ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSM REFERENTE AOS TESTES UTILIZADOS NO MANUSCRITO 1	145
	ANEXO D – DIREITOS AUTORIAIS DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA EXPERIMENTAL NEUROLOGY	146
	ANEXO E – DIREITOS AUTORIAIS DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA PAIN®	147

1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune do sistema nervoso central (SNC) marcada por processos inflamatórios e extensa desmielinização dos neurônios (FOLEY et al., 2013; THOMPSON et al., 2018a). As manifestações clínicas e o curso da EM são heterogêneos. Nas fases iniciais, a maioria dos pacientes apresentam episódios reversíveis de déficits neurológicos, que duram dias ou semanas, caracterizando as fases iniciais da doença, que podem ser síndrome clinicamente isolada ou EM recorrente-remitente (EMRR) (FILIPPI et al., 2018; THOMPSON et al., 2018a).

Com o tempo, o desenvolvimento de déficits neurológicos permanentes e a progressão da incapacidade clínica tornam-se proeminentes apresentando a forma conhecida como EM secundária progressiva (EMSP). Todavia, apenas uma pequena parte dos pacientes desenvolve um curso progressivo da doença desde o início, que é descrito como EM progressiva primária (EMPP) (FILIPPI et al., 2018; THOMPSON et al., 2018a). Cada subtipo de EM pode ser classificado como ativo ou não ativo com base na avaliação clínica da ocorrência de recaída ou atividade da lesão detectada usando ressonância magnética. Além disso, pacientes com EMPP ou EMSP, podem ser classificados de acordo com progressão das lesões ao longo de um dado tempo (FILIPPI et al., 2018; KRIEGER et al., 2016; THOMPSON et al., 2018a). Esse acompanhamento segue um protocolo padronizado, sendo os critérios de McDonald o protocolo mais utilizado em pesquisas e na prática clínica (THOMPSON et al., 2018a).

Os pacientes normalmente manifestam os primeiros sintomas de EM entre 20 e 40 anos de idade, sendo uma doença com maior prevalência de desenvolvimento em mulheres para a forma EMRR (LASSMANN, 2019; RAHN et al., 2014). Durante as fases de início da EM, como resultado do processo inflamatório e neurodegenerativo agudo, os pacientes com EM manifestam vários sintomas que incluem perda da acuidade visual (neurite óptica), fraqueza, desequilíbrio (ataxia), fadiga, déficit cognitivo e alterações sensoriais (dor) (GALEA; WARD-ABEL; HEESSEN, 2015). A dor é considerada o principal sintoma sensorial apresentando uma prevalência de 63% em pacientes com EM, sendo as formas mais comuns de dor a enxaqueca e a dor neuropática (FOLEY et al., 2013; SOLARO; MESSMER UCCELLI, 2011; TRUINI et al., 2012).

Os anticonvulsivantes são a primeira linha de tratamento para a dor neuropática em pacientes com esclerose múltipla, sendo análogos ao ácido gama-aminobutírico (GABA), pregabalina e gabapentina as principais escolhas terapêuticas (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014; SOLARO; MESSMER UCCELLI, 2011). O tratamento dos sintomas de dor de cabeça em pacientes com EM segue a mesma abordagem farmacológica da população em geral (HUSAIN; PARDO; RABADI, 2018). Um dos medicamentos mais utilizados nas crises agudas de enxaqueca na clínica é o succinato de sumatriptana que é um agonista dos receptores de serotonina 5-HT1 (BECKER, 2015). No entanto, sabe-se que as terapias atuais para o tratamento da dor na EM demonstram eficácia reduzida, causando muitos efeitos adversos e uma redução substancial na qualidade de vida dos pacientes (FERRARO et al., 2018; URITS et al., 2019). Portanto, novas estratégias e a descoberta de novos mecanismos no manejo da dor são essenciais para o tratamento da EM.

Neste contexto, o estresse oxidativo é uma característica patológica crucial em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a EM (MAHAD; TRAPP; LASSMANN, 2015; TOBORE, 2021). O processo inflamatório na EM leva a um extenso recrutamento de células imunes para o SNC com ativação glial e aumento da produção de espécies reativas. Além disso, foi demonstrado que o processo oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento da nocicepção em distintos modelos de dor (NASSINI et al., 2014; TREVISAN et al., 2013c, 2016). Um estudo recente mostrou que o antioxidante, ácido alfa-lipoico, diminuiu a nocicepção em um modelo EMRR conhecido como encefalomielite autoimune experimental remitente-recorrente (EAE-RR) em camundongos (KHAN et al., 2015). Assim, a investigação do mecanismo envolvido no desenvolvimento da dor via estresse oxidativo na EMRR e na EMP é relevante.

Dentre os possíveis novos alvos terapêuticos para dor na EM, temos a família de receptores de potencial transitório (TRPs), os quais têm sido descritos como alvo de espécies reativas geradas pelo desequilíbrio do processo de estresse oxidativo (BORKUM, 2016; NASSINI et al., 2014; NILIUS; SZALLASI, 2014). O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) é um canal iônico expresso em neurônios sensoriais de detecção de dor nos sistemas nervoso central e periférico. Esse receptor pode ser ativado por substâncias endógenas, produtos do estresse oxidativo, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 4-hidroxinonenal (4-HNE), e óxido nítrico (MARONE et al., 2018; MATERAZZI et al., 2013; NASSINI et al., 2014; TREVISAN et al., 2013b).

Além disso, estudos observaram uma atenuação do comportamento da nocicepção em diferentes modelos de dor neuropática, principalmente de origem periférica, quando utilizou-se a inibição farmacológica dos canais TRPA1 (DE LOGU et al., 2017, 2019a; MATERAZZI et al., 2012). Em um modelo de constrição do nervo ciático houve um aumento de H₂O₂ ativando os canais TRPA1 e levando ao desenvolvimento de alodinia mecânica (DE LOGU et al., 2017). Em um modelo de enxaqueca pela injeção de gliceril trinitrato também se observou o aumento de subprodutos do estresse oxidativo, H₂O₂ e 4-HNE, ambos capazes de ativar os canais TRPA1 presentes no gânglio trigeminal de camundongos (MARONE et al., 2018).

Diferentes estudos demonstraram que as cefaleias primárias são um dos sintomas mais comuns em esclerose múltipla (EM) apresentando uma prevalência superior a 50% sendo um sintoma de difícil tratamento (BECKMANN; TÜRE, 2019; WANG et al., 2021). Nesse contexto, os canais TRPA1 surgiram como um alvo específico para vários desencadeadores de cefaleias primárias, e algumas evidências demonstraram que os medicamentos metamizole e propifenazona, usados para o controle da enxaqueca, têm uma ação inibitória na atividade do canal TRPA1 (BENEMEI et al., 2017; KUNKLER et al., 2011; MATERAZZI et al., 2013; NASSINI et al., 2014, 2015). Alguns compostos majoritários de plantas, como a isopetasina e o partenolide, tem como mecanismo de ação a dessensibilização de neurônios nociceptivos e inibem a liberação de CGRP através da ativação dos canais TRPA1 (BENEMEI et al., 2017; MATERAZZI et al., 2013).

Atualmente, antagonistas e bloqueadores dos receptores de CGRP tem sido desenvolvidos para o tratamento de enxaqueca, sendo os gepants a classe mais conhecida. Além disso, a administração de injeções de CGRP pela via subcutânea na área periorbital de camundongo ou diretamente no gânglio trigeminal (intraganglionar) levou ao desenvolvimento de alodinia mecânica periorbital (AMP) em camundongos (ARAYA et al., 2020; DE LOGU et al., 2019b). Em outro estudo, usando modelo de camundongo de EMP induzida por imunização com o antígeno MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund (ACF), também se observou o desenvolvimento de alodinia mecânica facial ao estímulo na almofada mistacial (whisker pad) (DUFFY et al., 2016, 2019).

Os canais TRPA1 estão expressos em diferentes tipos celulares como em astrócitos (SHIGETOMI et al., 2011) e oligodendrócitos (HAMILTON et al., 2016), podendo desempenhar um papel na neuroinflamação em diferentes patologias.

Inicialmente, este receptor foi estudado no sistema nervoso periférico por seu envolvimento na dor e inflamação, sendo coexpresso com TRP vanilóide 1 (TRPV1) em um subconjunto de neurônios sensoriais primários (AKOPIAN, 2010). Além disso, um coativador de TRPA1/TRPV1 demonstrou eficácia na redução dos escores de dor em um ensaio clínico de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA) (SHORT et al., 2018). Estudos prévios mostraram que a ativação de TRPA1 expresso em astrócitos induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios em um modelo de doença desmielinizante induzida por cuprizona em camundongo, o que contribui para a progressão do apoptose de oligodendrócitos (KRISZTA et al., 2019). Além disso, foi demonstrado o aumento da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador específico de astrócitos ativados no tecido do córtex e da medula espinal de camundongos induzidos ao modelo EAE-RR (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). Outros resultados observaram o aumento de molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba)-1 no corpo caloso, hipocampo e na região lombar da medula espinal de camundongos induzidos a EAE-RR (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). No entanto, até a realização do presente estudo a relação entre a ativação do TRPA1 e a regulação de marcadores de neuroinflamação nos modelos de EMRR e EMP em roedores ainda não havia sido investigada.

Desta maneira, este trabalho teve três objetivos principais para avaliar o envolvimento dos canais TRPA1 nos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da nocicepção e neuroinflamação através de dois modelos de EM em roedores. Primeiramente, avaliou-se o envolvimento dos canais TRPA1 no desenvolvimento de sintomas do tipo dor neuropática em camundongos induzidos à EAE-RR. Após, investigou-se o desenvolvimento de sintomas do tipo dor de cabeça em animais induzidos à EAE-RR e envolvimento dos canais TRPA1 neste processo nociceptivo. E finalmente, estudou-se o papel do TRPA1 no desenvolvimento de nocicepção e alteração de marcadores inflamatórios comparando os dois modelos de EM.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

A EM é considerada uma doença inflamatória no sistema nervoso central (SNC), na qual a infiltração de linfócitos leva a danos na bainha de mielina de axônios (COMPSTON; COLES, 2008; THOMPSON et al., 2018b). Além disso, é considerada a doença neurológica mais amplamente estudada em termos epidemiológicos sendo a primeira causa de incapacidade não traumática em adultos jovens (CHEN; CHONGHASAWAT; LEADHOLM, 2017; FILIPPI et al., 2018).

Diferentes estudos apontam como chave para o desenvolvimento da EM as alterações no sistema imunológico adaptativo composto pelos linfócitos T e B (HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015; HOHLFELD et al., 2016). Essas células são recrutadas para o SNC por antígenos (autoantígenos) gerando um processo de autoimunidade, porém ainda não se sabe a causa e quais antígenos específicos estão relacionados a esse processo (HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015; THOMPSON et al., 2018b).

A resposta autoimune pode ocorrer de duas maneiras na forma intrínseca ou extrínseca ao SNC. De forma intrínseca se supõe que pode haver alguma alteração das células do sistema imunes no SNC que liberam antígenos para a periferia por drenagem pelos linfonodos ou pelas células apresentadoras de antígenos. Essa liberação de antígenos gera um processo pró-inflamatório que possivelmente leve a resposta autoimune que atinge posteriormente o SNC. Já na forma extrínseca se sugere que devido a um evento no sistema periférico, por exemplo, uma infecção sistêmica leve a uma resposta imune aberrante contra o SNC. Essa alteração da resposta imune gera a liberação de antígenos e ativação de linfócitos que invadem o SNC (HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015; THOMPSON et al., 2018b).

O sistema imune inato também tem um papel importante no início e progressão da EM, pois os macrófagos promovem as respostas pró-inflamatórias de linfócitos T e B que levam aos danos teciduais da doença. Além disso, a ativação microglial precoce pode ser um dos eventos iniciais no desenvolvimento de lesões de esclerose múltipla. Quando ativadas, as células microgliais podem contribuir para a patologia da doença através de vários possíveis mecanismos, incluindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, radicais livres e aumento da liberação de glutamato

(THOMPSON et al., 2018b). As principais características fisiopatológicas da EM são a perda axonal ou neuronal, desmielinização e gliose astrocitária. Entre essas características neuropatológicas, a perda axonal ou neuronal, ou seja, a neurodegeneração é particularmente relevante por ser o principal mecanismo envolvida na incapacidade clínica permanente dos pacientes com EM (THOMPSON et al., 2018b).

Sabe-se que a EM afeta predominantemente adultos jovens e diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento da EM como fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida. Os fatores risco mais bem estabelecidos são a infecção pelo vírus Epstein-Barr (VEB) na adolescência e no início da idade adulta, a exposição ao tabaco de forma ativa ou passiva, falta de exposição ao sol, baixos níveis de vitamina D e obesidade na adolescência. Outros fatores de risco menos estabelecidos incluem trabalho noturno, consumo excessivo de álcool ou cafeína (OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2016). Ademais, o componente genético pode ser reforçado pelo fato de que a maioria dos casos de EM ocorrem em caucasianos e raramente em outras etnias como em chineses, japoneses ou africanos. Em todo o mundo a estimativa é que 2,5 milhões de pessoas são acometidas pela EM e se observa uma prevalência de 50-300 pacientes a cada 100.000 indivíduos (KOCH-HENRIKSEN; SØRENSEN, 2010; OH; VIDAL-JORDANA; MONTALBAN, 2018; THOMPSON et al., 2018b). Pacientes diagnosticados com EM são mais frequentes nas regiões com clima temperado em ambos os hemisférios, porém esse fator pode mudar de acordo com o lugar onde os indivíduos viveram seus primeiros anos de vida (NEGROTTO; CORREALE, 2018). Além desses dados, já foi descrito que há uma maior incidência de desenvolvimento da forma EMRR em mulheres do que em homens (NEGROTTO; CORREALE, 2018; THOMPSON et al., 2018b; VOSKUHL; SAWALHA; ITOH, 2018). No Brasil existem poucos estudos epidemiológicos publicados sobre a EM, mas pode-se observar que o Brasil tem uma prevalência de baixa à média para a ocorrência desta doença sendo que a maior incidência ocorre na região sul-sudeste (DA GAMA PEREIRA et al., 2015).

O diagnóstico da EM é baseado na integração de exames clínicos, de imagem e laboratoriais. O diagnóstico clínico de EM consiste basicamente na avaliação da ocorrência de dois ou mais episódios diferentes de disfunção do SNC, com resolução pelo menos parcial, o que é suficiente para o diagnóstico de EMRR (FILIPPI et al., 2018; THOMPSON et al., 2018a). Embora o diagnóstico possa ser feito na apenas

com base em critérios clínicos, a ressonância magnética pode apoiar, complementar ou substituir alguns critérios clínicos devido à sensibilidade e especificidade desta modalidade de imagem demonstrando lesões desmielinizantes, bem como modo de disseminação espacial (no córtex ou medula espinal) e temporal (tempo entre as análises de imagem) dessas lesões. A última versão de avaliação clínica foi atualizada através dos critérios de McDonald de 2017 que englobam dados clínicos, de imagem e laboratoriais que enfatizam a necessidade de demonstrar o modo de disseminação espacial e temporal das lesões desmielinizantes, assim como de excluir diagnósticos de outras patologias (FILIPPI et al., 2018; THOMPSON et al., 2018a). Os testes laboratoriais acabam por desempenhar um papel de apoio, pois nenhum deles é específico e os resultados ainda não tem reprodutibilidade em todos os pacientes. Um exemplo de exame laboratorial é a pesquisa de bandas oligoclonais de imunoglobulina IgG no líquido cefalorraquidiano (OH; VIDAL-JORDANA; MONTALBAN, 2018; THOMPSON et al., 2018a).

Partindo do diagnóstico da EM, esta pode ser classificada em três tipos de acordo com o curso clínico: EMRR, EMPP e EMPS (SCHWENKENBECHER et al., 2019). O curso da EMRR é geralmente episódico, com fases recorrente-remitentes da EM, caracterizadas por respostas mediadas pelo sistema imunológico, tais como a ativação generalizada da micróglia e infiltrados celulares maciços no SNC (LASSMANN, 2019). Uma terceira forma, a EMSP, se caracteriza por uma fase inicial com períodos de surto-remissão assim como na EMRR e pode apresentar a fase progressiva depois de 20 anos após os primeiros sintomas. Estudos mostram que cerca de 2% dos pacientes que apresentam os sintomas de EMRR podem se converter em EMPS, porém ainda não se sabe os fatores envolvidos nesta transição (ROVARIS et al., 2006). A EMPP é o fenótipo clínico menos comum e acomete cerca de 10% a 15% da população com EM e é igualmente comum entre homens e mulheres. Esse fenótipo tende a ocorrer em uma população com idade mais avançada (cerca de 50 anos) quando comparada com a EMRR e a progressão começa lentamente desde o início, sem recidivas identificáveis (BALDASSARI; FOX, 2018; FAISSNER et al., 2019). A maior parte das terapias modificadoras da doença aprovadas são para o tratamento dos processos inflamatórios característicos da EMRR. Porém existe uma escassez no desenvolvimento de terapias para as formas EMPP e EMSP, a qual devem ser focadas no processo de desmielinização (BALDASSARI; FOX, 2018; FAISSNER et al., 2019).

No decorrer da evolução das diferentes formas de EM os pacientes desenvolvem diversas alterações neurológicas e funcionais como déficits cognitivos, alterações motoras, perda de visão e alterações sensoriais (MAZHARI, 2016; OH; O'CONNOR, 2015; THOMPSON et al., 2018b). Um exemplo comum de alteração visual é a neurite óptica que é resultado da inflamação aguda no nervo óptico pelo processo inflamatório e de desmielinização característicos da EM levando a perda da visão e dor o movimentar os olhos (THOMPSON et al., 2018b). Dentre as alterações cognitivas observa-se prejuízo na memória de trabalho, na percepção espacial e visual, e na fala. Já as alterações locomotoras caracterizam-se por redução na velocidade, distância e assimetria na marcha o que leva a redução da mobilidade e independência nas atividades cotidianas (MAGGIO et al., 2019). Todas essas alterações ainda podem ser somadas a algumas comorbidades como depressão, ansiedade, hipertensão e doenças hepáticas crônicas. Um conjunto crescente de evidências sugere que as comorbidades afetam o diagnóstico da EM ao longo do curso da doença e podem aumentar as taxas de mortalidade (MARRIE, 2017). A dor aparece nas primeiras fases do curso da EM causando alterações negativas e significativas na qualidade de vida dos pacientes (FERRARO et al., 2018; GALEA; WARD-ABEL; HEESSEN, 2015; MOTL; SUH; WEIKERT, 2010; TRUINI et al., 2012). Os principais tipos de dor descritas pelos pacientes são a enxaqueca e a dor neuropática central. A dor neuropática central se apresenta principalmente na forma de alodinia mecânica ou ao frio, sendo o tratamento desses sintomas na maioria das vezes ineficaz (FERNANDEZ-DE-LAS-PENAS et al., 2015; ÖSTERBERG; BOIVIE; THUOMAS, 2005). Neste contexto, se torna de grande relevância a elucidação dos mecanismos envolvidos nos processos dolorosos presentes na EM, bem como a procura de novos alvos terapêuticos para este sintoma.

2.2 DOR

A dor é uma sensação desagradável, mas também é um componente essencial do sistema de defesa do nosso organismo. Nos casos em que se pode ter uma lesão grave, como queimar a mão ao encostar em uma panela aquecida no fogão, existe um mecanismo de resposta reflexa para a dor. Este mecanismo é gerado como uma forma de aviso rápido, onde o sistema nervoso inicia uma resposta motora para afastar a mão da panela a fim de minimizar os danos físicos causados pela exposição ao calor

nocivo, por exemplo (YAM et al., 2018). A falta da capacidade de sentir dor, como na condição rara de insensibilidade congênita à dor, pode causar problemas de saúde muito graves, como automutilação, auto amputação e lesões na córnea (BENNETT; WOODS, 2014). Neste contexto, a percepção é o processo que nos permite interpretar informações sensoriais como, por exemplo, comer determinado alimento e sentir um gosto desagradável ou ouvir determinada música e gostar da melodia. Esse tipo de distinção também pode ser aplicado à dor. A dor é uma percepção que nos permite interpretar certo tipo de informação sensorial e existem órgãos especializados nessa sinalização (MCCARBERG; PEPPIN, 2019).

Antes de entender os mecanismos deve-se compreender a diferença entre os conceitos de dor e nocicepção de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês *International Association for the Study of Pain* - IASP) (APKARIAN, 2019; BALIKI; APKARIAN, 2015; RAJA et al., 2020). O termo nocicepção se refere a sinais que chegam ao sistema nervoso central resultante da ativação de neurônios sensoriais com terminações livres chamados nociceptores. Esses nociceptores tem função de fornecer as informações sobre danos tecidual sendo essa sinalização essencial para impedir algum dano grave no organismo (BALIKI; APKARIAN, 2015; RAJA et al., 2020). Já a dor, segundo a IASP, é uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial (RAJA et al., 2020). Desse modo, a dor é considerada subjetiva, pois cada indivíduo aprende seu significado de acordo com as experiências com algum tipo de lesão que tiveram nos primeiros anos de vida (VERRIOTIS et al., 2016). Portanto, não se trata apenas de uma experiência relacionada aos mecanismos que podem causar danos reais aos tecidos, mas está também relacionada com as experiências emocionais (MCCARBERG; PEPPIN, 2019; VERRIOTIS et al., 2016).

O processo de nocicepção está relacionado aos mecanismos envolvidos na percepção de estímulos térmicos, mecânicos ou químicos intensos que seguem determinadas vias de sinalização da dor que podem se dividir em via espinotalâmica relacionada a dor corporal e via trigeminal relacionada a dor na face (MCCARBERG; PEPPIN, 2019). Após detecção desses estímulos pelas terminações livres dos nociceptores, estes são propagados até seus corpos celulares que estão localizados nos gânglios da raiz dorsal para o corpo, gânglios trigeminais para a face e nos gânglios nodoso e vagal para as vísceras (MCCARBERG; PEPPIN, 2019). Logo,

esses neurônios são considerados pseudo-unipolares, pois possuem terminações centrais (medula espinal e tronco cerebral) e também periféricas (tecido nervado), são responsáveis pela detecção de estímulos nociceptivos na periferia e transmissão para as estruturas centrais (MCCARBERG; PEPPIN, 2019).

As transmissões dos estímulos nociceptivos se dão através de duas classes principais de fibras, a primeira classe inclui as fibras aferentes mielinizadas A δ de calibre médio que medeiam a dor primária ou rápida, aguda e localizada. Já a segunda classe de nociceptores incluem as fibras C não mielinizadas de pequeno calibre que transmitem a dor secundária ou lenta, e pouco localizada (BASBAUM et al., 2009; MCCARBERG; PEPPIN, 2019). Geralmente, as fibras responsáveis pela condução dos estímulos nocivos são as fibras A δ e C, porém as fibras aferentes mielinizadas de grande diâmetro A β estão também envolvidas na transmissão de estímulos sensoriais. Esses estímulos, primeiramente inócuos, são transmitidos como estímulos nocivos após sensibilização e ocorrem geralmente em condições de dor crônica (BASBAUM et al., 2009; MCCARBERG; PEPPIN, 2019; VON HEHN; BARON; WOOLF, 2012; WOOLF, 2010).

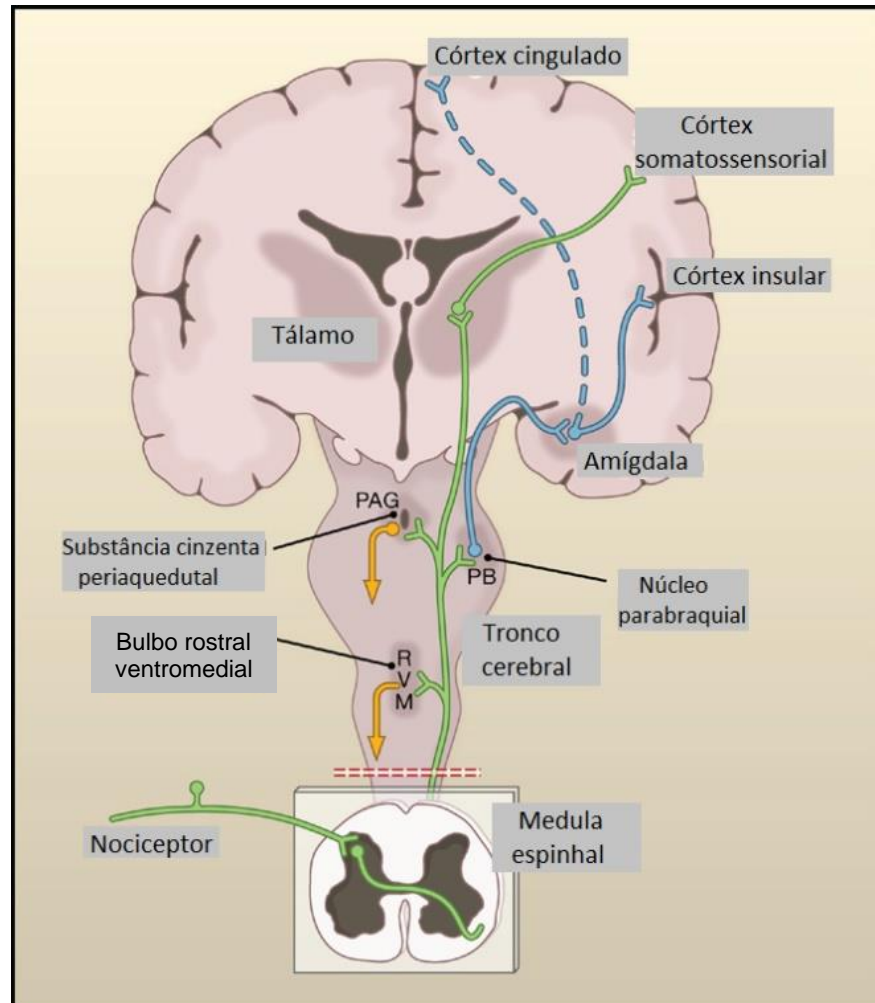
Desta maneira, a nocicepção inclui diferentes tipos de processos fisiológicos, sendo os estímulos sensoriais dolorosos, após uma ativação inicial dos nociceptores, transmitidos até o corno dorsal da medula espinal através da geração de um potencial de ação (YAM et al., 2018). Nas lâminas I, II e V da medula espinal ocorre a sinapse entre as terminações centrais dos neurônios nociceptivos e os neurônios nociceptivos de segunda ordem, pois ocorre à liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, a substância P e o CGRP (SCHOU et al., 2017). Para que ocorra a sinapse entre esses neurônios e a liberação dos neurotransmissores é necessária a ativação de diferentes canais iônicos que promovem o influxo de íons cálcio. Dentre os canais iônicos temos os canais de cálcio dependentes de voltagem (do tipo N principalmente), mas outros canais também podem estar envolvidos nesse processo como os TRPs (SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020).

Já a via trigeminal segue pelo tálamo analogamente a medula espinal da via espinotalâmica. Os estímulos nociceptivos são transmitidos pelas vias do nervo trigêmeo composto dos nervos oftálmico, maxilar e mandibular até os corpos celulares que se encontram no gânglio trigeminal. A transmissão segue para os neurônios de segunda ordem presentes no núcleo espinal do trigêmeo no tronco encefálico e posteriormente até o tálamo (TERRIER; HADJIKHANI; DESTRIEUX, 2022). Depois

do processamento na medula espinal e no tronco encefálico, o estímulo nociceptivo segue para as vias supraespinais através das fibras axonais de segunda ordem e isto ocorre por duas vias principais: a via espinotalâmica e a via espinobraquial amigdaloide. A atividade discriminatória do estímulo nocivo ocorre pela via espinotalâmica e via trigeminal, que possui as terminações dentro do tálamo ventroposterior e ventrobasal e, posteriormente, se projetam para o córtex somatossensorial (BASBAUM et al., 2009; MCCARBERG; PEPPIN, 2019; OSSIPOV et al., 2010). Já na via espinobraquial amigdaloide os axônios provenientes do corno dorsal da medula espinal terminam no núcleo parabraquial, e têm projeções para o hipotálamo e a amígdala, sendo essas áreas responsáveis por modular as dimensões afetivas da dor (BASBAUM et al., 2009; MCCARBERG; PEPPIN, 2019; OSSIPOV et al., 2010) como mostrado na Figura 1

Diversos estudos demonstraram que em situações que levam a dores extremamente intensas ocorre uma resposta fisiológica que é capaz de bloquear a sinalização ascendente da dor (HUANG et al., 2019; OSSIPOV et al., 2010). Essa modulação da dor existe na forma de uma via de inibição descendente onde a substância cinzenta periaquedutal recebe aferências de diferentes áreas do SNC como o hipotálamo, a amígdala e o córtex cingulado anterior rostral. A ativação da PAG pode modular dois sistemas inibitórios descendentes de forma principal, o locus cerúleo e bulbo rostral ventromedial (CHEN; HEINRICHER, 2019; HUANG et al., 2019). A substância cinzenta periaquedutal controla indiretamente a informação nociceptiva podendo levar a ativação dos neurônios serotoninérgicos presentes na bulbo rostral ventromedial e a liberação de serotonina (OSSIPOV et al., 2010). Já a ativação de neurônios do locus cerúleo leva a liberação de noradrenalina como mostrado abaixo na Figura 1. Ambas as vias têm sido estudadas em diversas condições de dor e utilizadas como um alvo para o tratamento de pacientes com dor crônica, como a dor neuropática (CORDERO-ERAUSQUIN et al., 2016; KREMER et al., 2018).

Figura 1 – Vias de sinalização ascendentes e descendentes relacionados à transmissão de estímulos dolorosos.



Fonte: adaptado de Basbaum et al., 2009

Legenda Figura 1: Os nociceptores transmitem os estímulos nocivos aos neurônios de projeção dentro do corno dorsal da medula espinhal. Um subconjunto desses neurônios de projeção transmite informações ao córtex somatossensorial através do tálamo, fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. Outros neurônios de projeção envolvem o córtex cingulado e córtex insular por meio de conexões no tronco cerebral (núcleo parabraquial) e amígdala, contribuindo para o componente afetivo da dor. Essa informação ascendente também acessa os neurônios do bulbo ventral rostral e da substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo para acionar as vias descendentes inibitórias da dor.

Durante o processamento das sensações dolorosas o limiar para provocar a dor deve ser alto o suficiente para não interferir nas atividades normais, mas baixo o suficiente para que possa ser evocado antes que ocorra dano real ao tecido. Esse

limite não é fixo e pode aumentar ou diminuir, gerando uma resposta adaptativa ou não (BLISS et al., 2016; CORDERO-ERAUSQUIN et al., 2016). As mudanças no limiar da dor e na capacidade de resposta podem ocorrer através de alterações no sistema nervoso que podem modular as respostas de qualquer estímulo sendo chamado de plasticidade neuronal. Dependendo das alterações de plasticidade ou modificação do sistema sensorial pode se desenvolver uma exacerbação na percepção dos sintomas dolorosos (BLISS et al., 2016; CORDERO-ERAUSQUIN et al., 2016). Devido a essas modificações do sistema sensorial alguns indivíduos podem desenvolver alodinia ou hiperalgesia. A alodinia se refere às sensações dolorosas evocadas por um estímulo que antes era considerado inofensivo. Já a hiperalgesia pode ser descrita como uma exacerbação na percepção de um estímulo que já era considerado nocivo (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; LOESER; TREEDE, 2008).

A dor pode ser classificada quanto ao seu tempo de evolução sendo chamada de dor aguda ou crônica. A dor aguda faz parte da resposta a trauma tecidual devido a alguma lesão ou processo cirúrgico, por exemplo. Esse tipo de dor faz parte do processo de cura e é de caráter transitório, ou seja, se resolve com a cura na região onde ocorreu o dano tecidual (HEINRICHER, 2016). Embora não exista uma delimitação de tempo, pode se classificar um prolongamento dos sintomas dolorosos de dor crônica. Neste tipo de dor se observa que apesar da cicatrização/cura da lesão a dor ainda persiste. Diferentes causas podem levar a prolongamento da dor, como doenças crônicas reumatológicas (artrite reumatoide), neurológicas (doença de Parkinson) e metabólicas (diabetes) ou mesmo lesões teciduais curadas previamente (HEINRICHER, 2016).

Ainda a dor pode ser classificada quanto ao aspecto fisiopatológico em dor nociceptiva, dor neuropática e nociplástica (FITZCHARLES et al., 2021; MEACHAM et al., 2017; ST. JOHN SMITH, 2018). A dor nociceptiva é o tipo de dor que está associada à proteção do organismo frente a um dano potencial (LOESER; TREEDE, 2008; ORR; SHANK; BLACK, 2017). Ademais, é o tipo mais comum de dor, sendo definido pela IASP como a dor que decorre de dano real ou ameaça de danos não neurais no tecido e pela ativação de nociceptores. Uma nota na definição deste termo na terminologia IASP afirma que este termo é projetado para se diferenciar da dor neuropática. Além disso, a dor associada à inflamação ativa também se enquadra nesta categoria (ORR; SHANK; BLACK, 2017). Já a dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial é chamada de dor neuropática

(MEACHAM et al., 2017). A dor neuropática é uma descrição clínica (e não um diagnóstico), pois necessita de investigações diagnósticas (por exemplo, imagem, neurofisiologia, biópsias, exames laboratoriais) que demonstrem uma anormalidade ou trauma em nervos (BREIVIK, 2002). Este tipo de dor ainda pode ser dividida em duas categorias gerais: dor neuropática central ou dor neuropática periférica (FINNERUP et al., 2016; HUANG et al., 2019; MEACHAM et al., 2017).

A dor neuropática periférica ocorre quando há lesões ou doenças que acometem o sistema somatossensorial periférico como o diabetes, tratamento do câncer com quimioterápicos, infecção pelo vírus Herpes zoster (MEACHAM et al., 2017). A dor neuropática central ocorre quando há lesões no sistema nervoso central, como um acidente vascular cerebral, ou alguma doença neurodegenerativa, como no caso da esclerose múltipla (MEACHAM et al., 2017; RACKE; FROHMAN; FROHMAN, 2022). E por fim, a dor nociplástica pode ser definida como uma dor decorrente da função alterada de vias sensoriais relacionadas à dor tanto na periferia quanto no SNC, causando aumento da sensibilidade (FITZCHARLES et al., 2021; WOOLF, 2011). Os mecanismos envolvidos na dor nociplástica não são totalmente compreendidos, mas acredita-se que exista uma alteração na modulação e sinalização sensorial. Os sintomas observados na dor nociplástica incluem dor multifocal sendo uma dor disseminada e/ou intensa (FITZCHARLES et al., 2021). Existem ainda a presença de outros sintomas como fadiga, sono, perda de memória e alterações de humor. Esse tipo de dor pode ocorrer isoladamente, como ocorre frequentemente em condições como fibromialgia ou cefaleia primárias (cefaleia tensional e enxaqueca), ou ainda como parte de um estado de dor mista em combinação com dor nociceptiva ou neuropática contínua, como pode ocorrer na dor crônica na região lombar (NIJS et al., 2021).

Desta forma, os diferentes tipos de sintomas dolorosos levam à diminuição significativa da qualidade de vida de muitos pacientes com EM (URITS et al., 2019). Neste sentido, é de grande importância a investigação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de dor em patologias crônicas e neurodegenerativas, como no caso da EM.

2.3 DOR NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Na população com EM, a dor é um sintoma frequente, acometendo de 63% dos pacientes e apresentando variações no tempo de início e no tipo de dor (FOLEY et al., 2013). Os sintomas dolorosos afetam o bem-estar físico e emocional do indivíduo e interferem na maioria das atividades da vida diária, como sono, trabalho e participação em atividades recreativas e sociais (EHDE et al., 2003; HADJIMICHAEL et al., 2007). Além da redução da qualidade de vida desses indivíduos a dor pode levar também ao desenvolvimento de comorbidades como, por exemplo, a depressão e ansiedade (MARRIE et al., 2015). Diferentes manifestações de dor são relatadas pelos pacientes, como espasmos dolorosos, especialmente nos membros inferiores. Esses espasmos são gerados devido a impulsos ectópicos, a partir das fibras motoras, como resultado de dano axonal e desmielinização sendo mais frequentes à noite (TRUINI et al., 2013). Dores de cabeça e lombalgia são muito comuns entre os indivíduos afetados durante todo o curso da doença (KISTER et al., 2010; NICOLETTI et al., 2008). É importante ressaltar que outras manifestações de dor ocorrem à medida que a doença progride. A espasticidade e a fraqueza progressiva comprometem a postura e a mobilidade do indivíduo, levando à osteoporose e às disfunções de tendões, ligamentos e/ou articulações, que evocam dores secundárias (TRUINI et al., 2013).

De acordo com o tipo de doença, a prevalência de dor é de 70%, tanto na EMPP e EMPS, e 50% na EMRR. O tipo mais comum de dor é a enxaqueca (52%) e dor neuropática (51%), sendo que a presença das duas ocorre em 32% dos pacientes com EM (BIBLE, 2013). A dor neuropática é mais comum em mulheres que apresentam maior incapacidade e maior duração da doença (SOLARO et al., 2018). Esse tipo de dor é amplamente experimentada entre indivíduos com EM e pode assumir várias formas com uma prevalência de quase 50% dos pacientes relatam a presença de sinais clássicos, como hiperalgesia e alodinia (BEISKE et al., 2004). Alguns estudos investigaram o processamento nociceptivo em pacientes com EM e observaram anormalidades nos limiares de dor térmica e também déficits nos limiares mecânicos em comparação com pessoas saudáveis (FERNANDEZ-DE-LAS-PENAS et al., 2015). A dor disestésica (em membros inferiores) é a forma mais comum de dor neuropática descrita como uma sensação de queimação, formigamento e latejamento constante nas pernas e pés (O'CONNOR et al., 2008). Ainda em outros estudos foi demonstrado que os pacientes com EM apresentavam menores limiares mecânicos de retirada e maior tempo de nocicepção ao frio em determinadas regiões do corpo quando comparados a pacientes sem dor (GRASSO et al., 2008).

Todos esses estudos sugerem a presença de transmissão nociceptiva anormal em indivíduos com EM, porém esses testes sensoriais quantitativos foram realizados somente em uma região e a maioria deles investigou apenas limiares térmicos (FERNANDEZ-DE-LAS-PENAS et al., 2015; ÖSTERBERG; BOIVIE, 2010). Para se confirmar a presença de transmissão nociceptiva anormal na EM devem ainda serem feitos testes sensoriais quantitativos em diferentes áreas do corpo para avaliar se há uma sensibilização generalizada (ÖSTERBERG; BOIVIE, 2010). Em modelos experimentais de EM já foram encontrados comportamentos de nocicepção como hiperalgesia e alodinia térmica relacionadas aos processo inflamatório no corno dorsal da medula espinal de animais induzidos aos modelos de EM (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014; OLECHOWSKI; TRUONG; KERR, 2009). Isto sugere uma possível relação entre a neuroinflamação e os comportamentos semelhantes à dor neuropática na EM.

Para o tratamento de dor neuropática na EM são usados principalmente os antidepressivos tricíclicos e os inibidores da recaptção da serotonina e noradrenalina, anticonvulsivantes, inibidores dos receptores de GABA, canabinoides (FERRARO et al., 2018; MIRABELLI; ELKABES, 2021; SOLARO; MESSMER UCCELLI, 2011) e opioides (MURPHY; BETHEA; FISCHER, 2017). Dentre a classe de antidepressivos tricíclicos e inibidores da recaptção da serotonina e noradrenalina são os medicamentos de primeira escolha no tratamento da dor neuropática na EM (MIRABELLI; ELKABES, 2021). Porém, são relatados como efeitos adversos comuns como sonolência, boca seca, prisão de ventre, retenção urinária e hipotensão e estudos clínicos randomizados não fornecem indicações quanto à eficácia geral ou aos esquemas posológicos mais vantajosos (HAYASHIDA; OBATA, 2019; KREMER et al., 2016, 2018; SOLARO; MESSMER UCCELLI, 2011). O antidepressivo duloxetina tem sido atualmente estudado como um potencial tratamento para a dor neuropática na EM (BROWN; SLEE, 2015; VOLLMER et al., 2014). Porém dos poucos estudos realizados constatou-se que o tratamento com duloxetina é capaz de aliviar os sintomas de dor, mas apresenta efeitos adversos intoleráveis como diminuição significativa do apetite (BROWN; SLEE, 2015; VOLLMER et al., 2014).

Dos medicamentos anticonvulsivantes mais usados no tratamento de dor neuropática na EM temos a carbamazepina, lamotrigina e pregabalina. A pregabalina é considerada um dos fármacos de primeira linha no tratamento da dor neuropática na EM (THOMPSON et al., 2018b). Esses medicamentos parecem ser eficazes, ou

pelo menos parcialmente, em alguns casos, mas a eficácia dessa classe de medicamentos como tratamento para dor neuropática ainda não foi comprovada em ensaios clínicos rigorosos. Além disso, muitos pacientes não conseguem fazer o uso na dose adequada para que os anticonvulsivantes tenham efeito nos sintomas de dor devido aos efeitos adversos intoleráveis, como tontura e sonolência excessiva (MURPHY; BETHEA; FISCHER, 2017; SOLARO; MESSMER UCCELLI, 2011).

Já para os sintomas de espasticidade o baclofeno, um inibidor dos receptores GABA-B, é usado por via intratecal para o tratamento de espasticidade grave na EM, porém os estudos para os efeitos deste medicamento ainda estão limitados a pequenos grupos e casos para sua eficácia (DARIO; TOMEI, 2007; NATALE et al., 2016; SAMMARAIEE et al., 2019). Os canabinoides parecem ter um efeito positivo na dor na EM, mas uma maior eficácia desses agentes quando comparado às terapias convencionais não foi ainda comprovada. Ensaios randomizados comparando canabinoides com medicamentos tradicionais para dor associada à EM são um próximo passo importante para determinar a terapia mais eficaz e para medir a influência de eventos adversos (NIELSEN et al., 2018; RUSSO et al., 2016; SOLARO; MESSMER UCCELLI, 2011). Mesmo sendo utilizados para o alívio da dor neuropática na EM, os canabinoides e opioides não são considerados como primeira linha de tratamento (MURPHY; BETHEA; FISCHER, 2017).

Como descrito anteriormente, a enxaqueca é um dos sintomas mais comuns em pacientes com EM junto a dor neuropática. Nesse contexto, de acordo com um estudo epidemiológico recente a prevalência estimada combinada de cefaleias primárias entre pacientes com EM é de 56%. A prevalência estimada combinada de enxaqueca (55%) foi maior em comparação com a de cefaleia do tipo tensional (20%). A prevalência do subtipo migrânea é de 16% e 10% para migrânea sem aura e migrânea com aura, respectivamente. A prevalência combinada de cefaleia primária no grupo caso-controle (57%) estava aproximadamente em linha com o grupo transversal (56%) (WANG et al., 2021). Outro fato importante é a relação entre a EM e a enxaqueca, onde normalmente a patologia ocorre entre 20 e 50 anos, com um pico de casos em paciente com 30 anos de idade, sendo que a prevalência de enxaqueca se encontra em uma faixa etária semelhante, entre 35 e 45 anos de idade (HUSAIN; PARDO; RABADI, 2018; WANG et al., 2021).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a presença de incidência maior de enxaqueca em pacientes com EM. Primeiramente, a causa de

desenvolvimento de cefaleias primárias na EM se dá pelo extenso processo inflamatório na região das meninges e dos giros do córtex cerebral (MAGLIOZZI et al., 2010; MÖHRKE; KROPP; ZETTL, 2013). Logo, já foi descrito em modelos de roedores que a inflamação durante o processo de desmielinização cortical na EM é capaz de acelerar a depressão alastrante cortical, sendo uma segunda teoria do desenvolvimento de enxaqueca na doença (MERKLER et al., 2009; PAKPOOR et al., 2012). Em terceiro lugar, outro possível mecanismo pode ser pela localização das placas de desmielinização. Um estudo retrospectivo de 277 pacientes com enxaqueca encontrou a presença de placas ativas de EM na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo em exames de ressonância magnética (GEE et al., 2005). Este estudo relatou que a presença de uma placa de EM no mesencéfalo foi associada a uma maior probabilidade de desenvolver enxaqueca; no entanto, devido à natureza retrospectiva do estudo, é difícil determinar se a enxaqueca ocorreu na ausência de uma lesão do mesencéfalo (GEE et al., 2005). Além das possíveis causas do desenvolvimento de cefaleias primárias pela própria doença, já foi descrito que os medicamentos usados no tratamento da EM, como interferon gama, também podem desencadear ou até exacerbar os sintomas de dor de cabeça (PATTI et al., 2012; PEREIRA et al., 2021; VILLANI et al., 2012). Um possível mecanismo para o desenvolvimento da dor de cabeça seja devido ao tratamento que resulta em um aumento na liberação de citocinas como interleucina (IL)-6 e do fator de necrose tumoral (TNF)- α (OLIVEIRA et al., 2017; WANG et al., 2015).

O tratamento de cefaleias primárias em pacientes com EM segue os mesmos princípios da população geral. Um diagnóstico preciso seguido de tratamento com medicamentos e modalidades não farmacológicas é a abordagem recomendada (HUSAIN; PARDO; RABADI, 2018). Uma estratégia abrangente de gerenciamento de enxaquecas deve incluir uma discussão sobre como evitar gatilhos como álcool, tabagismo e alguns alimentos, bem como seguir um plano de higiene do sono (HUSAIN; PARDO; RABADI, 2018). Os sintomas de dor de cabeça levam ao uso excessivo de medicamentos, principalmente quando os pacientes apresentam crises agudas, e mesmo sendo um sintoma comum na EM os estudos randomizados continuam escassos (BECKMANN; TÜRE, 2019). A cronicidade da dor de cabeça leva a uma diminuição da qualidade de vida dos pacientes além do desenvolvimento de outras comorbidades (MARRIE, 2017; MINEN et al., 2016).

Os agentes para o tratamento da enxaqueca mais comuns são os antiepilépticos, antidepressivos, bloqueadores beta-adrenérgicos, antagonistas de canais de cálcio, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e inibidores da enzima conversora de angiotensina (SILBERSTEIN, 2015). Os AINEs são geralmente um bom ponto de partida para o tratamento da enxaqueca aguda, embora o paracetamol (acetaminofeno) pode ser usado se houver contra-indicações ao uso de AINEs. Um dos mecanismos recentemente descrito para o paracetamol seria através dos canais TRPA1 e seu metabólito, a N-acetil-p-benzoquinonaimina, já foi descrito como um potente agonista dos canais TRPA1 (GENTRY; ANDERSSON; BEVAN, 2015). Diferentemente dos AINEs, as triptanas são agonistas serotoninérgicos dos receptores 5-HT₁ e são uma das classes mais prescritas para o tratamento das crises agudas de enxaqueca (BECKER, 2015). Todas as triptanas disponíveis tem ação vasoconstritora e, portanto, são contra-indicadas em pacientes com doenças cardiovasculares (LIPTON; BIGAL; GOADSBY, 2004; ROBERTO et al., 2015). Embora vários ensaios clínicos comparativos sugeriram que os AINEs são tão eficazes quanto os triptanos e para alguns pacientes, as triptanas são os medicamentos para crises de enxaqueca aguda mais eficazes disponíveis (BECKER, 2015; LIPTON; BIGAL; GOADSBY, 2004).

Neste contexto, o CGRP e os seus receptores são expressos em neurônios trigeminais que formam fibras C e fibras A δ e já foi visto que durante as crises de enxaqueca há liberação de CGRP no fluxo venoso craniano que leva ao desenvolvimento dos sintomas característicos das crises (EDVINSSON, 2017). Assim, o CGRP é um neuropeptídeo que desempenha um papel chave no desenvolvimento das crises de enxaqueca. Dentre as novas abordagens bem-sucedidas para o tratamento de enxaqueca aguda têm como alvo o desenvolvimento de terapias que abordam a inibição da ação do CGRP. Atualmente, os antagonistas dos receptores de CGRP, os gepants e os anticorpos monoclonais contra o CGRP demonstraram efeito significativo no alívio da enxaqueca aguda e crônica em ensaios clínicos (DE LOGU et al., 2018; EDVINSSON, 2017).

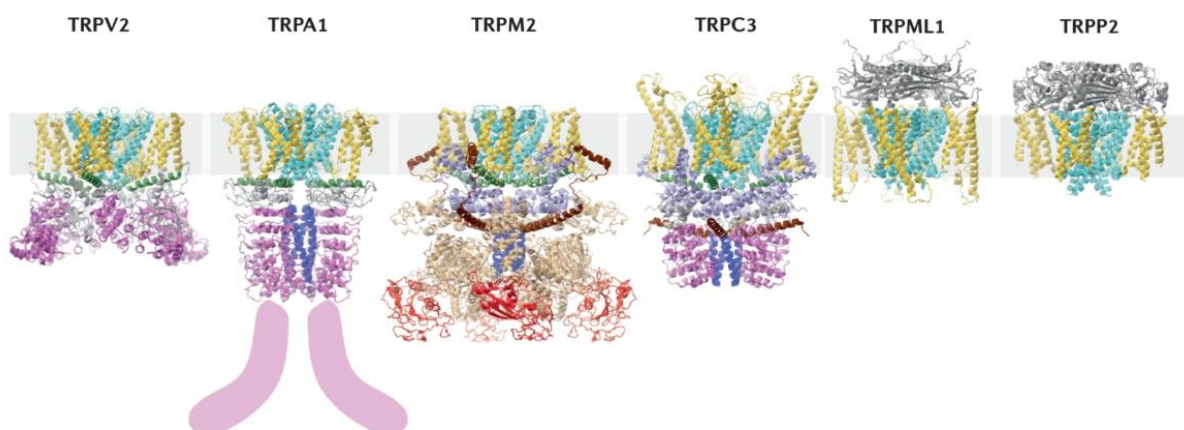
Dessa forma, a ativação celular de astrócitos e células imunes são capazes de exacerbar o processo inflamatório na EM levando a uma diminuição da capacidade antioxidante do organismo e a aumento da produção de mediadores inflamatórios (BRAMBILLA, 2019). Logo, os subprodutos do estresse oxidativo na EM podem então

estar envolvidos nos processos de ativação do receptor TRPA1 e o desenvolvimento dos processos de nocicepção.

2.4 RECEPTOR TRPA1

Os TRPs são canais iônicos que possuem em sua estrutura seis domínios transmembrana (S1-S6) com regiões de comprimento variável nas porções amino- (NH₂) e carboxi (COOH) que estão localizadas intracelularmente (OWSIANIK et al., 2006; ZHAO; MCVEIGH; MOISEENKOVA-BELL, 2021). Essa família de receptores foi primeiramente descrita nos fotorreceptores da mosca do gênero *Drosophila*. Nos mamíferos, os canais TRP consistem em 28 proteínas de membrana sendo classificadas em seis subfamílias: TRPC (canônico), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) e TRPA (anquirina) (ZHAO; MCVEIGH; MOISEENKOVA-BELL, 2021). Como previsto a partir de sua homologia de sequência para canais dependentes de voltagem, todos os canais TRP têm a transmembrana S1-S4 segmentos que formam domínios de detecção periféricos, enquanto S5 e S6 tetramerizam para criar uma central poro (ZHAO; MCVEIGH; MOISEENKOVA-BELL, 2021) (Figura 2)

Figura 2 – Representação estrutural da estrutura das diferentes famílias de receptores TRPs.



Fonte: Adaptado de Koivisto et al., 2021

Diferentes conformações desses canais conferem a esses poros diferentes seletividades para a condução de íons. Além dessas diferentes conformações e permeabilidades a cátions, os TRPs podem ser ativados por uma ampla variedade de

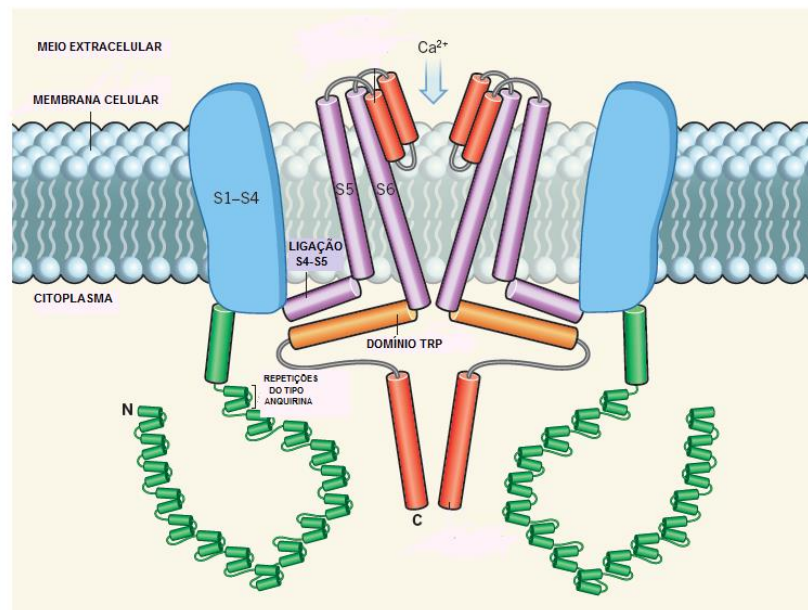
estímulos (KANEKO; SZALLASI, 2014; ZHAO; MCVEIGH; MOISEENKOVA-BELL, 2021). Esses receptores podem ser ativados por estímulos químicos (compostos químicos exógenos, produtos do estresse oxidativo, ácidos) e físicos (estímulos mecânicos, luz, temperatura), além de possuírem diferentes tipos de mecanismos de regulação (transcrição, glicosilação, fosforilação) e uma ampla distribuição em todos os tecidos. Todas essas características e diversidades conferem aos TRPs a definição de sensores polimodais (KANEKO; SZALLASI, 2014; MORAN; SZALLASI, 2018; NASSINI et al., 2014). Os canais TRPs estão expressos nas membranas celulares de quase todas as células, exceto no envelope nuclear da mitocôndria. Localizados nos neurônios sensoriais primários os TRPs desempenham importante papel na percepção das sensações dolorosas (KANEKO; SZALLASI, 2014; NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012).

Os compostos naturais são uma ferramenta de grande utilidade para a identificação e manipulação de elementos chave dos mecanismos da dor (JULIUS, 2013; MEOTTI; LEMOS DE ANDRADE; CALIXTO, 2014). Neste contexto, a capsaicina, um composto pungente presente em pimentas, possui a propriedade de dessensibilizar nociceptores que expressam o receptor TRPV1. Essa propriedade é dose e tempo-dependente, pois em baixas concentrações são capazes de excitar os neurônios aferentes, porém em altas concentrações a capsaicina leva a um aumento de influxo de Ca^{2+} através do canal levando a sua dessensibilização (SZALLASI; BLUMBERG, 2007). Desta forma a capsaicina é utilizada terapêuticamente para o tratamento de dor neuropática causada por infecções virais, como na infecção por Herpes zoster (BACKONJA et al., 2008). Os receptores TRPV1 estão colocalizados com os receptores TRPA1 sendo ambos expressos nos chamados neurônios peptidérgicos, pois são capazes de produzir neuropeptídeos CGRP e a substância P (GEPPETTI; HOLZER, 1996). Portanto, a ativação de ambos os receptores leva a liberação desses neuropeptídeos que estão estritamente relacionados com uma série de respostas inflamatórias com grande relevância nos estudos em doenças que geram sintomas dolorosos como diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (BASSO; ALTIER, 2017; DUITAMA et al., 2020; NASSINI et al., 2014; SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020).

Neste contexto temos os canais TRPA1 que foram primeiramente identificados em cultura de células humanas de fibroblastos do pulmão (JAQUEMAR; SCHENKER; TRUEB, 1999). Posteriormente foi descrito em outras espécies de mamíferos como

camundongo, rato, cachorro e em invertebrados como o peixe-zebra, mosca-da-fruta e *Caenorhabditis elegans* (NILIUS; APPENDINO; OWSIANIK, 2012). Como todos os membros da família de TRPs, o TRPA1 possui seis domínios transmembrana (S1-S6) com um poro entre as regiões S5 e S6 e possui um maior número (14-18) de repetições do tipo anquirina em seu longo domínio amino-terminal (NILIUS; OWSIANIK, 2011) como pode ser observado na Figura 3. O receptor TRPA1 é considerado um canal de cátions não seletivo, sendo despolarizado principalmente devido ao influxo de íon Na^+ e Ca^{2+} (STARUSCHENKO; JESKE; AKOPIAN, 2010). Além dessas características esse receptor apresenta diversos resíduos de cisteína que conferem a capacidade de ser ativado por compostos reativos através da mudança de conformação dos mesmos (SAMAD et al., 2011). O TRPA1 é abundantemente expresso nos neurônios sensoriais primários dos gânglios da raiz dorsal, gânglio trigeminal e gânglio vagal. Geralmente as fibras dos neurônios que expressam o TRPA1 são do tipo não mielinizadas C ou pouco mielinizadas A δ , raramente fibras bastante mielinizadas (BHATTACHARYA et al., 2008; STORY et al., 2003). Porém, nos últimos anos se tem evidenciado a presença de TRPA1 em tecidos não neuronais como em células do endotélio vascular (EARLEY, 2011), em fibroblastos da pele e da polpa dentária (JAIN et al., 2011; KIM et al., 2011), no trato gastrointestinal (KONO et al., 2013) e, portanto, pode estar relacionado a diferentes mecanismos de regulação nos processos inflamatórios não só no SNC (SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020). Estudos mais recentes relataram a presença de TRPA1 em células gliais, como astrócitos (TAKIZAWA et al., 2018), oligodendrócitos (HAMILTON et al., 2016) e células de Schwann (DE LOGU et al., 2017, 2019b).

Figura 3 – Estrutura do receptor TRPA1



Fonte: Adaptado de Clapham, 2015

Legenda Figura 3: Esquema das principais características do canal TRPA1. Duas subunidades TRPA1 são mostradas, embora o canal seja composto por quatro. Cada subunidade contém seis domínios α -helicoidais que atravessam a membrana, S1–S6. Duas hélices de poros ligam S5 e S6 na superfície extracelular, onde uma constrição regula o influxo de Ca^{2+} . O domínio helicoidal TRP faz parte de uma segunda constrição inferior. Dezesesseis repetições de anquirina na extremidade amino-terminal (N) da subunidade cobrem uma estrutura em espiral carboxi-terminal (C), fornecendo uma grande superfície citoplasmática para interações com agentes nocivos. É provável as interações moleculares de ligantes com repetições de anquirina que levam a mudanças conformacionais, transmitidas através da estrutura ligante S4-S5, que abrem o canal. A constrição inferior é fechada para íons na estrutura e pode estar em um estado fechado ou dessensibilizado.

Geralmente, os agonistas do canal TRPA1 podem ser classificados em moléculas não eletrofílicas que ativam o canal de forma não covalente e moléculas eletrofílicas reativas ao grupo tiol que modificam covalentemente o canal (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019; SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020). O primeiro grupo de agonistas de TRPA1 inclui compostos que são incapazes de modificar covalentemente os canais TRPA1 incluindo alguns compostos de origem vegetal

como o mentol, timol e carvacrol. Outros ativadores não covalentes são nicotina, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, e alguns medicamentos como clotrimazol, nifedipina e anti-inflamatórios não esteroides, como diclofenaco e ibuprofeno (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019). O segundo grupo de agonistas inclui uma série de compostos encontrado em plantas como o isotiocionato de alila (AITC), alicina, cinamaldeído. Outros estão presentes em produtos químicos industriais e irritantes voláteis como a acroleína, crotonaldeído, formalina ou os anestésicos como isoflurano, lidocaína, propofol (MEENTS; CIOTU; FISCHER, 2019; SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020).

Ainda nesse grupo de agonistas que modificam covalentemente os canais TRPA1 temos algumas moléculas geradas a partir do desenvolvimento de processo inflamatório ou algum dano tecidual como H_2O_2 , 4-HNE, óxido nítrico e metilglioxal (NASSINI et al., 2014; SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020). A respiração celular através da cadeia transportadora de elétrons está associada com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas principalmente através das enzimas NADPH oxidases (MA et al., 2017). Dentre as EROs temos o H_2O_2 , ozônio, oxigênio singlete e os peróxidos orgânicos que podem estar aumentados em processos de dano tecidual ou processo inflamatório. Além disso, as espécies reativas de intermediária de nitrogênio (ERINs) como o óxido nítrico também podem estar aumentadas em diversas patologias. Tanto as EROs quanto as ERINs podem reagir com as membranas lipídicas gerando o que chamamos de espécies reativas de carbonil (ERC) como o 4-HNE (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014; NASSINI et al., 2014). Quando ocorre um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante pode se desenvolver um processo de estresse oxidativo no organismo, resultando em diversas alterações, inclusive a ativação de vias para o aumento de processos inflamatórios e relacionados à dor. Neste contexto temos o TRPA1 expresso nos neurônios sensoriais primários que já foi descrito como um dos mais importantes sensores do estresse oxidativo e nitrosativo. Desta forma, a ativação do TRPA1 por EROs, ERINs e ERC estão associadas com o prolongamento de estímulos dolorosos mecânicos e ao frio (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014; JULIUS, 2013; NASSINI et al., 2014; SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020).

Apesar da função do TRPA1 como quimiossensor ser bem definida, evidências demonstram que esse receptor pode desempenhar também o papel de termo sensor e/ou mecanossensor (BENEMEI et al., 2015; LAURSEN et al., 2015; ZAPPIA et al.,

2017). Desde que o TRPA1 foi descrito como sensível a temperaturas frias nocivas (< 17°C), o seu papel na sensibilidade ao frio tem sido extensamente debatido (LAURSEN et al., 2015; STORY et al., 2003). No entanto, vários estudos demonstraram que a sensação aguda ao frio nocivo é alterada em camundongos nocautes para o TRPA1 e, ainda mais importante, que este está relacionado no desenvolvimento da alodinia ao frio induzida por modelos animais de inflamação, de lesão nervosa e de neuropatia periférica (ANDERSSON et al., 2008; CHEN et al., 2011; KARASHIMA et al., 2009; KWAN et al., 2006; MATERAZZI et al., 2012; NASSINI et al., 2011; TREVISAN et al., 2013a). Além disso, foi demonstrado que as respostas aos estímulos de frio eram independentes do Ca²⁺, mas não se pode excluir a função desse íon que pode ser um importante regulador dessas respostas *in vivo* (KARASHIMA et al., 2009; SAWADA et al., 2007). Atualmente existem evidências substanciais de estudos *in vitro* e *in vivo* do envolvimento do TRPA1 nas respostas ao frio nocivo em roedores, mas em humanos esse processo ainda não está bem elucidado (BANDELL et al., 2004; CHEN et al., 2013; JORDT et al., 2004).

Outro papel importante do TRPA1 é o seu envolvimento na hipersensibilidade mecânica (NASSINI et al., 2014; SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020). Evidências demonstram que o TRPA1 pode ser ativado após administração de solução hipertônica e que algumas moléculas anfipáticas podem causar uma curvatura na membrana celular e levar a modulação da atividade desse receptor (COREY et al., 2004; HILL; SCHAEFER, 2007; KINDT et al., 2007). Os modelos de dor inflamatória e neuropática em roedores sugerem um papel fundamental do TRPA1 no desenvolvimento de alodinia e hiperalgesia mecânica (BOYETTE-DAVIS; WALTERS; DOUGHERTY, 2015; KOIVISTO et al., 2022; MEOTTI et al., 2017; PARK et al., 2015).

Atualmente se tem um grande interesse no desenvolvimento de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios com alvo nos canais TRPA1, pois diferentes estudos demonstram o seu envolvimento em doenças inflamatórias e com sintomas de dor (ANTONIAZZI et al., 2019; BÖLCSKEI et al., 2018; DE ALMEIDA et al., 2020; DE LOGU et al., 2019a; LEE et al., 2021; MATERAZZI et al., 2013; TREVISAN et al., 2013c, 2016). O HC-030031, um antagonista seletivo dos canais TRPA1, demonstrou efeito antinociceptivo quando administrado o agonista do TRPA1, alil isotiocianato, e também em um teste de nocicepção pela administração de formalina (MCNAMARA et al., 2007). Outros antagonistas foram descobertos posteriormente como o A-967079,

AP18 e Chembridge-5861528 sendo importantes ferramentas farmacológicas para os estudos do envolvimento do TRPA1 nos diferentes modelos de doenças (CHEN et al., 2011; KOIVISTO et al., 2012; PETRUS et al., 2007; WEI et al., 2009).

O papel do TRPA1 na dor inflamatória pode acontecer de duas maneiras: uma por ser sensibilizado e/ou ativado nos nociceptores através de agentes pró-inflamatórios, e outra por liberar neuropeptídeos que levam ao aumento do processo inflamatório (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; GEPPETTI; HOLZER, 1996). Os primeiros estudos relacionando a dor inflamatória e a ativação dos canais TRPA1 foram através da observação do desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e ao frio em um modelo de injeção subcutânea e intra-articular ACF (DUNHAM; KELLY; DONALDSON, 2008; OBATA et al., 2005). Outros estudos corroboraram com essas evidências demonstrando que os antagonistas HC-030031 e o AP18 foram capazes de diminuir os efeitos evocados pela administração de ACF (DA COSTA et al., 2010; EID et al., 2008; MCGARAUGHTY et al., 2010; PETRUS et al., 2007). No modelo de nocicepção por injeção de formalina se observou que o bloqueio farmacológico e a deleção do TRPA1 também foram capazes de diminuir os comportamentos de nocicepção na pata de roedores (MCNAMARA et al., 2007).

Diferentemente da dor inflamatória, a dor neuropática é dependente da lesão ou disfunção no sistema geralmente causado devido a um dano periférico. A dor neuropática periférica induzida por quimioterápicos (DNIQ) é um dos efeitos adversos mais comuns no câncer, levando a diminuição significativa da qualidade de vida dos pacientes e ao abandono do tratamento (COLVIN, 2019). Sabendo que o TRPA1 pode ser ativado por diferentes compostos, se propôs que os diferentes tipos de quimioterápicos poderiam ativar diretamente o canal. Os quimioterápicos para o tratamento do câncer de mama denominados inibidores da aromatase; como o letrozol, o exemestano e anastrozol podem causar sintomas de dor muscular e articular. Estes quimioterápicos são capazes de ativar o receptor TRPA1 diretamente e causar edema dependente da inflamação neurogênica, nocicepção aguda e alodínia mecânica e ao frio (FUSI et al., 2014). Também, o substrato da aromatase a androstenediona, que é um hormônio esteroide pode ativar o receptor TRPA1, e estes dois mecanismos estariam envolvidos na hipersensibilidade muscular e articular observada após a administração dos inibidores da aromatase (DE LOGU et al., 2016).

Por outro lado, outros modelos de DNIQ demonstraram que o tratamento com paclitaxel, oxaliplatina, bortezomibe e cisplatina não foram capazes de induzir o influxo

de cálcio em neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal ou causar resposta mediada pelo TRPA1 em células HEK293 transfectadas com o TRPA1 (MATERAZZI et al., 2013; NASSINI et al., 2011; TREVISAN et al., 2013a). Em um estudo utilizando o modelo de DNIQ induzido pelo paclitaxel, tanto os comportamentos nociceptivos de alodinia mecânica quanto os de alodinia ao frio demonstraram uma atenuação com a administração de um antagonista do TRPA1 ou um composto antioxidante (MATERAZZI et al., 2013). Além disso, a deleção gênica do TRPA1 foi capaz de diminuir a hipersensibilidade gerada pela administração de bortezomibe em camundongos, e os mesmos resultados se apresentaram após a administração de antagonistas do TRPA1 ou um composto antioxidante (ácido α -lipoico). A administração preventiva de HC-030031 ou ácido α -lipoico foram capazes de inibir o desenvolvimento de hipersensibilidade após a administração de bortezomibe e oxaliplatina (TREVISAN et al., 2013a).

Recentemente foi demonstrado o papel do TRPA1 no desenvolvimento de alodinia mecânica e ao frio em um modelo de DNIQ. A via de sinalização para o desenvolvimento de alodinia se dá através da liberação de IL-6 e ativação dos canais TRPA1, pois quando bloqueada foi capaz atenuar os sinais nociceptivos da indução (LIU et al., 2019). Em outro estudo de DNIQ por talidomida e seus derivados foi visto que o estresse oxidativo gerado por essa indução leva ao desenvolvimento de alodinia mecânica e ao frio através da ativação dos canais TRPA1. Neste caso observou-se os tratamentos por via intratecal (injeção no espaço subaracnoide) e intraplantar com os antagonistas do TRPA1, HC-030031 e HC-067047, foram capazes de atenuar alodinia ao frio e parte da alodinia mecânica induzida pela administração de talidomida (DE LOGU et al., 2020b). Dessa maneira, o canal TRPA1 parece ser ativado por compostos oxidantes e agentes inflamatórios produzidos após a administração de quimioterápicos como o bortezomibe, oxaliplatina, paclitaxel e talidomida, mantendo a alodinia mecânica e ao frio observada nos camundongos (NASSINI et al., 2014; SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO et al., 2020).

Os primeiros estudos do envolvimento do TRPA1 e o desenvolvimento de dor neuropática foram em modelos de lesão da medula espinal (OBATA et al., 2005). Através desse modelo foi demonstrada a presença de um mecanismo compensatório, onde se teve um aumento da expressão do TRPA1 e aumento da sensibilização após o dano na medula e também em outros modelos de constrição do nervo ciático (CASPANI et al., 2009; KATSURA et al., 2006; STAAF et al., 2009). Para comprovar

o envolvimento do TRPA1 neste modelo, alguns outros estudos demonstraram o efeito antinociceptivos do HC-030031 e do A-967079 nos comportamentos de alodinia mecânica e ao frio, respectivamente (CHEN et al., 2011; EID et al., 2008).

Já foi descrito também que o TRPA1 atua como um mediador em um modelo de dor neuropática através da constrição do nervo infraorbital. Observou-se em outros estudos que os antagonistas do TRPA1 (HC-030031 e A967076), a deleção gênica e o tratamento com antioxidantes (ácido α -lipoico e apocinina) foram capazes de atenuar os comportamentos nociceptivos induzidos pelo modelo. Ademais, foi demonstrado que os comportamentos de nocicepção são gerados pela ativação do TRPA1 por espécies reativas liberadas por macrófagos e monócitos (DE LOGU et al., 2017; TREVISAN et al., 2016). Em um modelo de dor complexa regional do tipo I, O tratamento repetido com um antagonista de TRPA1 uma hora antes e por 3 dias após isquemia/reperfusão protegeu permanentemente camundongos induzidos contra neuroinflamação e alodinia (DE LOGU et al., 2020a).

Além dos modelos de dor neuropática, o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas também está relacionado à ativação do TRPA1. Já foi visto que a ativação do TRPA1 e o influxo de Ca^{2+} desempenha um papel crucial na regulação da inflamação derivada de astrócitos na doença de Alzheimer. Essa ativação contribui para a toxicidade das placas β -amilóides e para a hiperatividade neuronal (BOSSON et al., 2017; LEE et al., 2016). Em dados muito recentes, o mesmo grupo de pesquisa, investigou se o tratamento com o antagonista HC-030031 teria um efeito protetor na progressão da doença quando administrado no início da superprodução de amiloide- β no modelo experimental. Como resultados, o bloqueio crônico do TRPA1 foi capaz de normalizar a atividade astrocitária, preveniu a disfunção neuronal e preservou a integridade sináptica estrutural. Esses efeitos protetores preservaram a memória de trabalho espacial neste modelo de camundongo com doença de Alzheimer. Além disso, o efeito tóxico da proteína amiloide- β nos astrócitos é desencadeado pela ativação do canal TRPA1, sendo fundamental para a progressão da doença de Alzheimer. O bloqueio do TRPA1 preveniu a disfunção neuronal irreversível, tornando este canal um potencial alvo terapêutico para promover neuroproteção nesta doença (PAUMIER et al., 2022). E um modelo de doença de Parkinson observou-se o aumento de acroleína e da expressão dos canais TRPA1 na substância nigra, estriado e córtex dos animais induzidos. Sabe-se que a acroleína é um agonista dos canais TRPA1 e desempenha um papel crucial no estresse oxidativo da doença de

Parkinson. O tratamento com um sequestrador de acroleína foi capaz de reverter a regulação positiva dos canais de anquirina 1 (TRPA1) e atenuar os déficits motores e sensoriais típicos da doença. Porém, ainda não foi investigado dos efeitos desse aumento da ativação dos canais TRPA1 e sua relação com o desenvolvimento da doença (SHI et al., 2021).

A lisofosfatidilcolina está relacionada no desenvolvimento da EM que desempenha papel essencial na inflamação neuronal e desmielinização. Em testes *in vitro*, viu que os danos celulares através do processo de estresse oxidativo induzido pela lisofosfatidilcolina via TRPA1 foi confirmada. Esses resultados demonstram o papel dos canais TRPA1 dano celular em oligodendrócitos causado pela lisofosfatidilcolina. Além disso, o bloqueio farmacológico desses receptores poderiam prevenir o processo de desmielinização visto neste modelo *in vitro* (TIAN et al., 2020). Em um modelo de EM induzido por cuprizona se observou que a ativação dos receptores TRPA1 aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} atuando na modulação das funções dos astrócitos, e dessa forma influenciando em vias pró ou antiapoptóticas dos oligodendrócitos (SÁGHY et al., 2016). Este mesmo grupo de estudo observou que a deleção gênica do TRPA1 foi capaz de diminuir os processos de desmielinização no modelo de cuprizona sendo um alvo terapêutico promissor para limitar os danos no sistema nervoso central em doenças desmielinizantes, porém não se estudou os comportamentos de nocicepção (BÖLCSKEI et al., 2018).

Dentre as diferentes doenças e modelos experimentais de dor, os canais TRPA1 também estão envolvidos no desenvolvimento dos sintomas de enxaqueca. Deste modo, a estimulação TRPA1 pode causar liberação de CGRP, e muitos gatilhos de enxaqueca ativam o TRPA1. Alguns medicamentos já usados para o tratamento da enxaqueca podem dessensibilizar ou inibir TRPA1 (BENEMEI et al., 2014), e portanto o canal pode ser considerado um alvo terapêutico para enxaqueca. A *Petasites Hybridus* é uma planta do Norte da Ásia, Europa e de algumas áreas da América do Norte conhecida por suas propriedades analgésicas para a enxaqueca. As flores são de cor avermelhadas sendo seu composto majoritário a isopetasina. Em um estudo para investigar os mecanismos para o alívio da enxaqueca desta planta viu-se que a ativação dos canais TRPA1 pela isopetasina resulta na excitação de nociceptores contendo neuropeptídeos, seguido por dessensibilização neuronal. Logo, os mecanismos de ação da *Petasites Hybridus* na atenuação da dor e da inflamação neurogênica na enxaqueca são relacionados a ativação dos canais TRPA1

(BENEMEI et al., 2017). Um dos principais constituintes da matricária, o partenolide, pode interagir com os sítios nucleofílicos dos canais TRPA1. Por ser culturalmente conhecida pelo seu efeito analgésico e anti-inflamatório se sugeriu que seus efeitos estavam relacionados a ligação com os canais TRPA1. Descobriu-se que o partenolide desempenha a função de um agonista parcial desses canais. Além disso, o mecanismo de ação contra os sintomas de enxaqueca se dá através da dessensibilização dos receptores TRPA1 nos terminais nervosos peptidérgicos. Este efeito do partenolide anula as respostas nociceptivas evocadas pela estimulação das terminações trigeminais periféricas. Logo, a ativação dos canais TRPA1 e a consequente dessensibilização neuronal por partenolide são capazes de inibir a liberação de CGRP (MATERAZZI et al., 2013).

A exposição a poluentes do meio ambiente e irritantes de fumaça, como acroleína e outros produtos químicos conhecidos como agonistas do TRPA1, induzem a liberação de CGRP e levam ao desenvolvimento de um processo inflamatório na região craniana (KUNKLER et al., 2011). Todos esses efeitos podem ser inibidos por antagonistas de CGRP ou TRPA1 (KUNKLER et al., 2011). Trinitrato de glicerila, que é conhecido por provocar ataques de enxaqueca em pacientes libera óxido nítrico, que induz respostas via TRPA1 (ASHINA et al., 2017; MIYAMOTO et al., 2009). O trinitrato de glicerila gera alodinia periorbital via ativação de TRPA1 e das enzimas NADPH1 e 2 dentro do soma de nociceptores trigeminais levando a liberação de EROs e CGRP (MARONE et al., 2018). Além disso, o sulfeto de hidrogênio, outro estimulante gasoso do TRPA1, pode contribuir para o mecanismo de enxaqueca (KOROLEVA et al., 2017)

Assim, a hipótese da presente tese é que a neuroinflamação nas lesões da EM sejam capazes de gerar espécies reativas, visando assim a ativação do TRPA1, que produz respostas dolorosas em um modelo de EM (EAE). Os radicais oxidantes gerados pela neuroinflamação podem ter como alvo TRPA1 expressos em terminais centrais de neurônios sensoriais primários, produzindo assim diretamente os sinais de dor. E ainda, pode ter como alvo o TRPA1 expressos em oligodendrócitos e/ou astrócitos, causando danos aos mesmos e desmielinização das fibras nervosas que conduzem os sinais de dor no SNC. Desta maneira pode se sugerir que um mecanismo similar pode estar relacionado com os sintomas de dor que são observados na EM e a investigação do papel do TRPA1 nos sintomas de dor na EM se torna de grande relevância.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do receptor TRPA1 na nocicepção e neuroinflamação observadas em modelos de EM em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar o desenvolvimento de alodinia mecânica e ao frio na pata traseira, e alodinia mecânica periorbital em um modelo de EMRR (RR-EAE);
- b. Testar fármacos já usados para o tratamento da dor neuropática (pregabalina) e cefaleia primária (sumatriptana e olcegepant) na EM e seus efeitos antinociceptivos em um modelo de EMRR (RR-EAE);
- c. Observar o efeito antialodínico da inibição farmacológica do receptor TRPA1 na nocicepção observada em um modelo de EMRR (RR-EAE) em camundongos;
- d. Avaliar o efeito antinociceptivo da administração de oligonucleotídeo anti-sentido por via intratecal e a expressão do receptor TRPA1 em um modelo de EMRR (RR-EAE);
- e. Avaliar os níveis dos agonistas endógenos do TRPA1 (H_2O_2 e 4-HNE) e a atividade das enzimas SOD e NADPH em um modelo de EMRR (RR-EAE);
- f. Avaliar o efeito antinociceptivo do tratamento com antioxidantes na hipersensibilidade observada em um modelo de EMRR (RR-EAE) em camundongos;
- g. Verificar o efeito antialodínico da deleção gênica do TRPA1 na nocicepção desenvolvida nos modelos de EMRR (EAE-RR) e EMP (EMP-EAE).
- h. Investigar o efeito antiinflamatório da deleção do receptor TRPA1 em marcadores de neuroinflamação, Iba-1 e GFAP, em amostras de medula espinal nos modelos de EMRR (EAE-RR) e EMP (EMP-EAE);
- i. Investigar o papel do TRPA1 nos modelos de EMRR (EAE-RR) e EMP (EMP-EAE) os escores clínicos dos animais induzidos e o marcador de desmielinização OLIG-2 em amostras de medula espinal através da deleção do receptor TRPA1.

4 ARTIGOS

Os resultados inseridos nesta tese apresentam-se sob a forma de artigos científicos, os quais se encontram aqui estruturados. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos artigos. O primeiro artigo está disposto conforme publicado para publicação na Revista Experimental Neurology, o segundo artigo está disposto conforme publicado para publicação na revista PAIN® e o manuscrito 1 está estruturado conforme será enviado para a revista Brain.

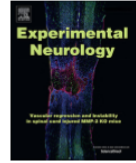
4.1 ARTIGO 1

Experimental Neurology 328 (2020) 113241



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Neurology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexnr

Research paper

TRPA1 activation mediates nociception behaviors in a mouse model of relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis

Diéssica Padilha Dalenogare^a, Maria Carolina Theisen^a, Diulle Spat Peres^a,
 Maria Fernanda Pessano Fialho^b, Débora Denardin Lückemeyer^c,
 Caren Tatiana de David Antoniazzi^a, Sabrina Qader Kudsi^a, Marcella de Amorim Ferreira^c,
 Camila dos Santos Ritter^a, Juliano Ferreira^c, Sara Marchesan Oliveira^b, Gabriela Trevisan^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 8804-0900 Florianópolis, SC, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

MOG₃₅₋₅₅
 Oxidative stress
 HC-030031
 Hydrogen peroxide
 4-hydroxynonenal
 NADPH oxidase

ABSTRACT

Central neuropathic pain is the main symptom caused by spinal cord lesion in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS), but its management is still not effective. The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a pain detecting ion channel involved in neuropathic pain development. Thus, the aim of our study was to evaluate the role of TRPA1 in central neuropathic nociception induced by relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) mouse model. In this model, we observed the development of similar clinical conditions of RRMS in C57BL/6 female mice through RR-EAE using MOG₃₅₋₅₅ antigen and Quil A adjuvant. At the thirty-fifth day post-induction, C57BL/6 female mice demonstrated alteration in the RR-EAE score without motor impairment, mechanical and cold allodynia. Also, significant changes in demyelinating (*Mog* and *olig-1*) and neuroinflammatory (*Iba1*, *Gfap* and *Tnfa*) markers were observed, but this model did not alter *Trpa1* RNA expression levels in the spinal cord. The hydrogen peroxide and 4-hydroxynonenal levels (TRPA1 agonists) were increased in RR-EAE induced mice, as well as the NADPH oxidase activity. The intragastric treatment of RR-EAE induced mice with TRPA1 antagonists (HC-030031 and A-967079) and antioxidant (α-lipoic acid and apocynin) caused an antiallodynic effect. Moreover, the intrathecal administration of TRPA1 antisense oligonucleotide, HC-030031, α-lipoic acid, and apocynin transiently attenuated mechanical and cold allodynia. Thus, TRPA1 plays a key role in the induction of neuropathic pain in this model of RR-EAE and can be a possible target for investigating the development of pain in RRMS patients.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) marked by inflammatory processes and extensive demyelination of neurons (Foley et al., 2013; Thompson et al., 2018). Patients normally manifest the first MS symptoms between 20 to 40 years of age, and the disease is prevalent among women (Lassmann, 2019; Rahn et al., 2014). Some patients can develop a severe type of MS, called primary progressive MS (Mahad et al., 2015; Mathey et al., 2018). Generally, 15 years after the first onset, the course of the disease is converted into a progressive type (secondary progressive MS) (Foley et al., 2013; Kalincik, 2015; Lassmann, 2019). However, most MS patients present the relapsing-remitting type (RRMS) that shows relapsing

phases, with exacerbation of symptoms and remission periods (Kalincik, 2015).

During the onset phases of RRMS, as a result of the acute inflammatory and neurodegenerative process, MS patients manifest several symptoms that include loss of visual acuity (optic neuritis), sensory alterations, weakness, imbalance (ataxia), fatigue, and cognitive impairment (Galea et al., 2015). Pain is considered the main sensory symptom showing a prevalence of 63% in MS patients, and the most common forms are migraine and neuropathic pain (Foley et al., 2013; Solaro and Messmer Uccelli, 2011; Truini et al., 2012). The current analgesics used in MS pain treatment demonstrate reduced effectiveness, causing many adverse effects and a substantial reduction in the patients' quality of life (Foley et al., 2013; Solaro and Messmer Uccelli,

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, building 21, room 5207, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: gabriela.trevisan-santos@ufsm.br (G. Trevisan).

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113241>

Received 11 October 2019; Received in revised form 31 January 2020; Accepted 7 February 2020

Available online 08 February 2020

0014-4886/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

2011). Therefore, new strategies and the discovery of new mechanisms in the management of pain are essential for MS treatment.

Oxidative stress is a crucial pathological characteristic in diverse neurodegenerative diseases, including MS (Mahad et al., 2015; Murphy, 2009). The inflammatory process in MS leads to an extensive recruitment of immune cells into the CNS with glial activation and an increase in reactive species. Moreover, it has been shown that the oxidative process could contribute to the development of nociception in distinct pain models (Nassini et al., 2011; Trevisan et al., 2013a, 2016). A recent study showed that the antioxidant, α -lipoic acid, decreased nociception in an RRMS model known as relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) in mice (Khan et al., 2015). Thus, the investigation of the mechanism involved in the development of pain via oxidative stress in RRMS is relevant.

The transient receptor potential (TRP) family has been described as a target of oxidative stress increase production (Nassini et al., 2014; Nilius and Szallasi, 2014; Trevisan et al., 2016). The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is an ionic channel expressed in pain-detecting sensory neurons in the peripheral and central nervous systems. This receptor can be activated by endogenous substances, products of oxidative stress, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Materazzi et al., 2013; Nassini et al., 2014; Trevisan et al., 2013a). The inhibition of TRPA1 showed attenuation of nociception behavior in different models of neuropathic pain (De Logu et al., 2017; Trevisan et al., 2016).

Besides, the relation between the TRP family and neuroinflammatory process in EAE model is well-described. The TRPs activation are involved with neuroinflammation process and cytokines release in EAE model that turns this receptor family a novel target for MS treatment (Bassi et al., 2019; Bianchi et al., 2018; Makar et al., 2015; Melzer et al., 2012; Musumeci et al., 2011; Paltser et al., 2013; Schattling et al., 2012; So et al., 2015). In a different model of demyelination using cuprizone it was described the role of TRPA1 on the demyelinating process (Bölskei et al., 2018; Kriszta et al., 2019; Sághy et al., 2016). However, the role of TRPA1 in neuroinflammation or nociception was not evaluated in any model of relapsing-remitting EAE.

The inflammatory and demyelinating process in MS may be involved with central neuropathic pain by producing TRPA1 agonists that can modulate sensory neurons causing pain hypersensitivity. Thus, the aim of our study was to evaluate the role of TRPA1 in central neuropathic nociception induced by RR-EAE mouse model.

2. Methods

2.1. Animals

C57BL/6 female mice (20–30 g) bred in-house and were maintained in controlled temperatures (22 ± 2 °C) with a 12-h light/dark cycle (lights on 7:00 am to 7:00 pm), were used. Animals were accommodated in ventilated cages (10 per cage) with wood shaving bedding and nesting material. Laboratory standard animal's food (Puro Lab 22 PB pelleted form, Puro Trato, Rio Grande do Sul, Brazil) and tap water were provided ad libitum. Each animal was used in just one experiment. The animals were moved and acclimatized to the experiment room for at least 1 h before each procedure. Experiments were performed according to the ethical guidelines to investigate pain in conscious animals (Zimmermann, 1983), and the procedures were approved by the Institutional Committee for Care and Use of the Federal University of Santa Maria (protocol #8640200617). The behavioral studies followed the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (Mcgrath and Lilley, 2015). All experiments were performed by an operator who was blinded concerning drug administration. Also, experimenters were blinded to the experimental group when performing the analysis. No animal or sample was excluded from the study.

2.2. Reagents

All experimental reagents, if not specified in the text, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mouse myelin oligodendrocytes glycoprotein (MOG_{35–55}) was synthesized by EZBioLab (Carmel, CA, USA). TRPA1 antisense oligonucleotide (TRPA1 AS ODN; 5' TCTATGCGGTTATGTTGG 3'), its mismatch (TRPA1 MM ODN; 5' ACTACTACACTAGACTAC 3'), and the RT-qPCR primers were acquired from Síntese Biotecnologia (Ribeirão Preto, SP, Brazil).

2.3. RR-EAE mouse model induction

In order to induce RR-EAE, an optimized mouse model of multiple sclerosis-induced neuropathic pain was performed with subcutaneous (s.c.) injection of 200 μ g of MOG_{35–55} antigen was used, mixed with 45 μ g of Quillaja saponin (Quil A) solution prepared in 100 μ l phosphate-buffered saline (PBS) (Khan et al., 2015; Khan et al., 2014). The mixture, containing MOG_{35–55} and Quil A, was injected in two equal aliquots (50 μ l) and administered into both flank regions only on day 0 (first day of immunization). Mice also received 250 ng pertussis toxin diluted in PBS (1 ng/ μ l) by intraperitoneal (i.p.) injection on day 0 and day 2 (48 h later). Control mice only received the corresponding doses of Quil A and pertussis toxin.

2.4. Assessment of RR-EAE clinical signs

The RR-EAE clinical signs in immunized mice and in the control group were assessed once a week over an experimental period of 35 days in a randomized blinded manner using the clinical disease scoring paradigm. The score was assessed according to the following scale: 0, normal behavior; 0.5, limpness of the distal tail region and hunched appearance; 1, completely limp tail or developing weakness in the hindlimbs; 1.5, limp tail and distinct hindlimbs weakness recognized by unsteady gait and poor grip of hindlimbs while hanging on cage underside; 2, limp tail with unilateral partial hindlimb paralysis; 2.5, limp tail and partial paralysis of bilateral hindlimbs; 3, complete paralysis of bilateral hindlimbs; 3.5, complete bilateral hindlimbs paralysis and unilateral forelimb paralysis; and 4, quadriplegia. RR-EAE disease was regarded as present if clinical scores were ≥ 1 , whereas clinical scores ≤ 0.5 were indicative of no disease or disease remission. Mice were monitored weekly after RR-EAE post induction for the assessment of the clinical signs and weight. If an animal showed a weight loss of 20–30% of the initial weight and if clinical score was more than 1.5 of clinical score of disease the animal was excluded from the experiments. However, all the induced animals developed the available clinical scores and nociception behaviors without significant weight loss. Therefore, we did not need to exclude any animals, as the RR-EAE demonstrated in a previous study (Khan et al., 2014).

2.5. Rotarod and open field testing +

The rotarod and open field test were performed to establish that there was no motor impairment in RR-EAE mice at nociceptive peak day post induction (p.i., day 35). First, the animals were trained on the rotarod apparatus one day before induction. This rotarod training consisted of placing the animal on the spinning cylinder for 60 s, at the fixed speed of 16 rpm, observing the latency to fall from the apparatus. This session was repeated two times. The rotarod test was performed on days 7, 14, 21, 28 and 35 using the same fixed speed for 180 s, and the animal's latency to fall was recorded (Olechowski et al., 2013; Olechowski et al., 2010; Olechowski et al., 2009). Animals with a clinical grade of ≥ 1 , or that failed to remain 180 s in the rotarod, were removed from the study (Olechowski et al., 2013).

The open field test was performed at nociceptive peak day p.i. (day 35); mice were placed into individual activity chambers (50 \times 50 \times 25 cm), without previous exposure. The locomotor activity

was analyzed according to the number of crossing (horizontal movements) and rearing (vertical movements), during 5 min (Trevisan et al., 2012).

2.6. Nociceptive tests

2.6.1. Von Frey test

The allodynia was defined as increase of neurons response following normally non-painful stimulus that refers to central pain sensitization (Loeser and Treede, 2008). To evaluate the development of mechanical allodynia, the mice were individually placed in transparent boxes on a wire mesh platform allowing easy access to the right hind paw plantar surface. Filaments of different stiffness were applied to the plantar surface of the hind paw, ranging from 0.07 to 2.0 g (0.07, 0.16, 0.40, 0.60, 1.0, 1.4, 2.0 g). The mechanical threshold was obtained according to the up-and-down paradigm (Chaplan et al., 1994; Tonello et al., 2014). This paradigm continued for a total of six measurements, or until four consecutive positive or four consecutive negative responses occurred. The mechanical paw-withdrawal threshold (in g) response was then calculated from the resulting scores (Dixon, 1980). To determine the baseline thresholds, the animals were acclimatized for 60 min before the test and all animals were assessed before RR-EAE induction (baseline values). The mechanical threshold was evaluated on days 7, 14, 21, 28 and 35 p.i. in RR-EAE or in control animals. On day 35 post RR-EAE induction, the mechanical threshold was measured before treatment (time 0), and 1 to 3 h after treatment delivered via intragastric (i.g.) administration, and 0.5 to 2 h after treatment delivered via intrathecal (i.t.) administration.

2.6.2. Cold allodynia test

The acetone test was used to evaluate cold thermal allodynia. The mice were placed in transparent boxes on an elevated wire mesh platform and acclimatized for 60 min. To determine the baseline threshold, the animals were tested prior to immunization. The technique consisted in applying 20 μ l acetone to the plantar surface of the right hind paw. The time that the animal spent lifting, licking or wagging the paw was counted for 60 s (Nassini et al., 2011; Trevisan et al., 2013b). Cold thermal allodynia was evaluated before RR-EAE induction and at days 7, 14, 21, 28 and 35 p.i. Nociceptive time to acetone was also measured 35 days after RR-EAE induction (time 0), or at 1 to 3 h after treatment by intragastric (i.g.) administration and at 0.5 to 2 h after injection by intrathecal treatment.

2.7. Treatment protocols

Pregabalin is a drug widely used in the clinical treatment of neuropathic pain in patients with MS (Thompson et al., 2018). This compound was used as a positive control and was administered by oral gavage (60 mg/kg i.g.) in RR-EAE induced mice to evaluate its antinociceptive effect (Hewitt et al., 2016).

The antinociceptive effect of TRPA1 antagonists HC-030031 and A-967079 (100 mg/kg, respectively, i.g.) were also evaluated (Antoniazzi et al., 2019; Trevisan et al., 2016). All treatments had a control group that received the correspondent vehicle (DMSO 1% in isotonic saline 0.9%). Moreover, animals were treated with two antioxidants, α -lipoic acid (sequesterant of ROS, 100 mg/kg, i.g.) and apocynin (NADPH oxidase inhibitor, 100 mg/kg, i.g.) by oral gavage (Trevisan et al., 2016). By intrathecal injection, the animals also received HC-030031, apocynin and α -lipoic acid (10 μ g/site, 5 μ l i.t.). For the intrathecal injection, the intervertebral space between L5 and L6 was punctured using a 28-gauge needle attached to a Hamilton microsyringe, and a total volume of 5 μ l was injected into non-anesthetised mice (Hylden and Wilcox, 1980; Trevisan et al., 2013c). All treatments had a control group that received the correspondent vehicle (DMSO 1% in isotonic saline 0.9%). All mice were tested before (baseline) and at day 35 after RR-EAE induction (time 0) or control group, in the mechanical and cold

allodynia assessment.

In order to elucidate the TRPA1 role in an RR-EAE model, the animals received intrathecal (i.t., 5 μ l) administration of TRPA1 antisense oligonucleotide (TRPA1 AS ODN; 5' TCTATGCGGTTATGTTGG 3'; 2.5 nmol/site) or its mismatch (TRPA1 MM ODN; 5' ACTACTACACTA GACTAC 3'; 2.5 nmol/site), each 12 h for 3 days (days 32, 33 and 34 p.i.) and 1 h before nociceptive tests in nociception peak day (day 35) (Antoniazzi et al., 2019).

2.8. Oxidative parameters

Immediately after behavioral assessments on day 35 after RR-EAE induction, the animals were euthanized and the spinal cord (L4-L6) was dissected. The samples were homogenized in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) and centrifuged at 3000 rpm 4 °C for 10 min.

2.8.1. TRPA1 agonists (4-HNE and H₂O₂) levels measurement

The concentrations of H₂O₂ and 4-HNE (TRPA1 agonists) were analyzed in the spinal cord (L4-L6), after induction of RR-EAE or its respective control. To determine the levels of H₂O₂, we used the phenol red-horseradish peroxidase (HRPO) method (da Brum et al., 2019). Briefly, 25 mM of sodium azide was added to supernatants to inhibit the cytochrome c oxidase enzyme present in samples (Leary et al., 2002). The homogenate containing sodium azide was centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4 °C. A mixture containing supernatant, 25 μ l of phenol red (100 mg/ml) and 5 μ l of HRPO (50 mg/ml) was incubated in the dark for 10 min at 25 °C. The reaction was stopped by NaOH (1 M). The absorbance of the enzymatic reaction was read at 610 nm using a SpectraMax i3* Platform (Molecular Devices, LLC) microplate reader. H₂O₂ levels are expressed as H₂O₂ nanomoles (nmol H₂O₂) per mg protein compared to a standard H₂O₂ sample.

The content of 4-HNE was analyzed using OxiSelect™ HNE adduct Competitive Elisa kit, in the same samples that were homogenized according to kit specifications and measured by immunofluorescence (Trevisan et al., 2016). The levels of 4-HNE were expressed in percentage of 4-HNE when compared with control group.

2.8.2. Assessment of the activity of NADPH oxidase

The activity of NADPH oxidase in the spinal cord (L4-L6) was evaluated as described before (Antoniazzi et al., 2019). The activity of NADPH oxidase was observed in samples using an appropriate assay kit (CYO100, cytochrome c reductase, NADPH Sigma-Aldrich, Milan, Italy). The NADPH oxidase activity was expressed as U/ml/g of tissue.

2.9. Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA from dorsal root ganglion and spinal cord were isolated using PureLink™ RNA Mini kit (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol and quantified using a Nanodrop ND-1000. cDNA was synthesized from 230 ng (dorsal root ganglion) and 500 ng (spinal cord L4-L6), of RNA treated with DNaseI (RNase-free, Invitrogen), using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantification of specific products was done using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), and double-stranded products were amplified using specific primers (Table 1) in StepOne™ equipment (Applied Biosystems) with the following protocol: 10 min 95 °C, (15 s 95 °C, 1 min 60 °C) x 40 cycles. A final step was included to obtain the dissociation curve (15 s 95 °C, 1 min 60 °C, 15 s 95 °C). Threshold cycles (Ct) calculated by StepOne Software v2.3 were normalized to the expression of the gene and were calculated by normalization with *Hprt* (hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase) and *Actb* (β -actin). Relative amounts were calculated using the 2^{- Δ ACT} method (Livak and Schmittgen, 2001). Primer specificity in all samples was confirmed by single peak performances of PCR products in melt curve analysis (Livak and Schmittgen, 2001). We analyzed the following RNA expression levels and their specific primer sequences were described in the table

Table 1

List of forward and reverse primers used on RT-qPCR assays and their respective sequences (5'–3').

Gene	Sequence forward (5'–3')	Sequence reverse (5'–3')	Accession number
<i>Trpa1</i>	GCAGGTGGAACCTCATACCAACT	CACITTTGCGTAAGTACCAGAGTGG	NM_177781
<i>Iba1</i>	AGGAGAAAACAAGAACACAAGA	CAATCAGGGCAGCTCGGAGATAGC	NM_019467
<i>Gfap</i>	TGCAGGAGTACCAGGATCTAC	GATCTGGAGGTTGGAGAAAGTC	NM_010277
<i>Olig1</i>	AAGGGCATGCAGGACCTGAACT	AGCGTGGCAATCTTGGAGAGCT	NM_016968.4
<i>Mog</i>	GATGAAGGAGGCTACACCTGCT	CGTAGGCACAAGTGCAGATGAGA	NM_010814
<i>Tnfa</i>	GTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	ATTGGGAACCTTCTCATCCCT	NM_013693
<i>Hprt</i>	GCACACTTTGCTTTCCCTGG	CAACAACAACCTGTCTGGA	NM_013556
<i>Actb</i>	CACACACGAGAAGTACCATTAT	TGCTGGAAGGTGGACAGTGGAG	NM_007393

below: *Mog* (Myelin-oligodendrocyte glycoprotein) and *Olig1* (Oligodendrocyte factor 1) are oligodendrocyte maturation markers. *Iba1* (ionized calcium-binding adapter molecule-1) and *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein) are microglial and astrocyte activation markers respectively. Cytokine *Tnfa* (Tumor necrose factor- α) is a pro-inflammatory cytokine.

2.10. Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm standard error of mean (S.E.M.) and analyzed statistically by parametric and nonparametric Student's *t*-test, one-way or two-way analysis of Variance (ANOVA) according to the experimental protocol, followed by the post-test Bonferroni when needed. The I_{max} was calculated using the following formula: $100 \times (\text{hour post treatment} - \text{mean of basal post induction}) / (\text{basal post induction mean} - \text{basal post induction mean})$. The individual values were inserted as column statistic in Prisma GraphPad* and calculate the mean of these values. To meet parametric assumptions, data of mechanical threshold scores were log transformed before analyses. Differences between groups were considered significant when *P* values were less than 0.05 ($P < .05$), using the GraphPad Prism 5.0 program.

3. Results

3.1. RR-EAE model caused clinical score changes without inducing locomotor alteration

The RR-EAE induced animals presented increased clinical scores from day 14 p.i., the onset of disease, and during time course after induction, which represents the relapsing-remitting disease profile (Fig. 1A). The mouse body weight did not present a significant difference between RR-EAE and control group during the 35 days of experiment (Fig. 1B). There were no observed changes in locomotor activity when the animals were assessed in the rotarod test day 7 to 35 p.i. (Fig. 1C). In addition, in the open field test, there was not a significant difference in the number of crossing (Fig. 1D) and rearing (Fig. 1E) when comparing RR-EAE and control groups.

3.2. The RR-EAE caused damage in myelin sheath and oligodendrocyte, microglial and astrocyte activation, and cytokine production in spinal cord samples

The RNA expression levels of *Mog* (Fig. 2A) and *Olig-1* (Fig. 2B) were decreased in the EAE group when compared to samples of control group. The *Iba1* (Fig. 2C), *Gfap* (Fig. 2D) and *Tnfa* (Fig. 2E) RNA levels were increased in the RR-EAE group when compared to the control group.

3.3. Mice developed mechanical and cold allodynia after RR-EAE induction

The RR-EAE induced mice presented mechanical allodynia from day 21 to 35 p.i. (Fig. 3A). Moreover, in a similar way, the RR-EAE induced animals showed cold allodynia with an increase of nociception time

from 21 to 35 days p.i. (Fig. 3B). The animals presented a maximal nociceptive response with no motor alteration at day 35 after RR-EAE induction; therefore, this day was chosen to measure the antinociceptive effect of treatment. Pregabalin is used in the clinical treatment of multiple sclerosis-induced central neuropathic pain (Daneshdoust et al., 2017), and this compound demonstrates the anti-allodynic and antihyperalgesic effects in this model of RR-EAE in mice. Pregabalin i.g. administration was able to reduce the mechanical allodynia induced by RR-EAE at 1 and 2 h post-dose, with maximal inhibition (I_{max}) of $74 \pm 7\%$ at 1 h after administration (Fig. 3C). This compound also showed an antiallodynic effect in cold allodynia at 1 and 2 h after treatment, with an I_{max} of $92 \pm 3\%$ at 1 h after its administration (Fig. 3D).

3.4. TRPA1 antagonists showed antinociceptive effect in the RR-EAE in mice

The antinociceptive effect was shown with i.g. administration of TRPA1 receptor antagonists HC-030031 (100 mg/kg) and A-967079 (100 mg/kg) (Fig. 4). HC-030031 and A-967079 reduced mechanical and cold allodynia from 1 to 2 h after i.g. administration. The calculated I_{max} values were $69 \pm 8\%$ and $61 \pm 14\%$ for the mechanical threshold reduction at 1 h for HC-030031 (Fig. 4A) and A-967079 (Fig. 4B), respectively. For cold allodynia, HC-030031 (Fig. 4C) I_{max} value was $73 \pm 7\%$ at 1 h, and A-967079 (Fig. 4D) I_{max} value was $70 \pm 13\%$ at 1 h after administration.

3.5. TRPA1 agonist production and NADPH activity were increased in the spinal cord of RR-EAE induced mice, but there was no increase in *Trpa1* RNA content

As was demonstrated the *Trpa1* RNA expression levels in spinal cord (Fig. 5A) and DRG (Fig. 5B), we did not observe alterations between the RR-EAE and control groups. In addition, RR-EAE induction was able to increase oxidative markers in the spinal cord of induced mice. We demonstrated the increase in H_2O_2 (Fig. 5C) and 4-HNE levels (Fig. 5D), and in the NADPH activity (Fig. 5E) in the spinal cord of the RR-EAE induced mice when compared to control group.

3.6. Systemic treatment with α -lipoic acid and apocynin reduced mechanical and cold allodynia in the RR-EAE induced-mice

The oral administration of antioxidant compounds, α -lipoic acid (100 mg/kg) and apocynin (100 mg/kg) were able to show an antinociceptive effect in the RR-EAE from 1 to 2 h after administration (Fig. 6). The calculated I_{max} values were $59 \pm 9\%$ to α -lipoic acid (Fig. 6A) and $82 \pm 16\%$ to apocynin (Fig. 6B) in reduction of mechanical allodynia at 1 h. Also, in cold allodynia assessment, α -lipoic acid presented I_{max} of $85 \pm 2\%$ (Fig. 6C) and apocynin $81 \pm 6\%$ 1 h after treatment (Fig. 6D).

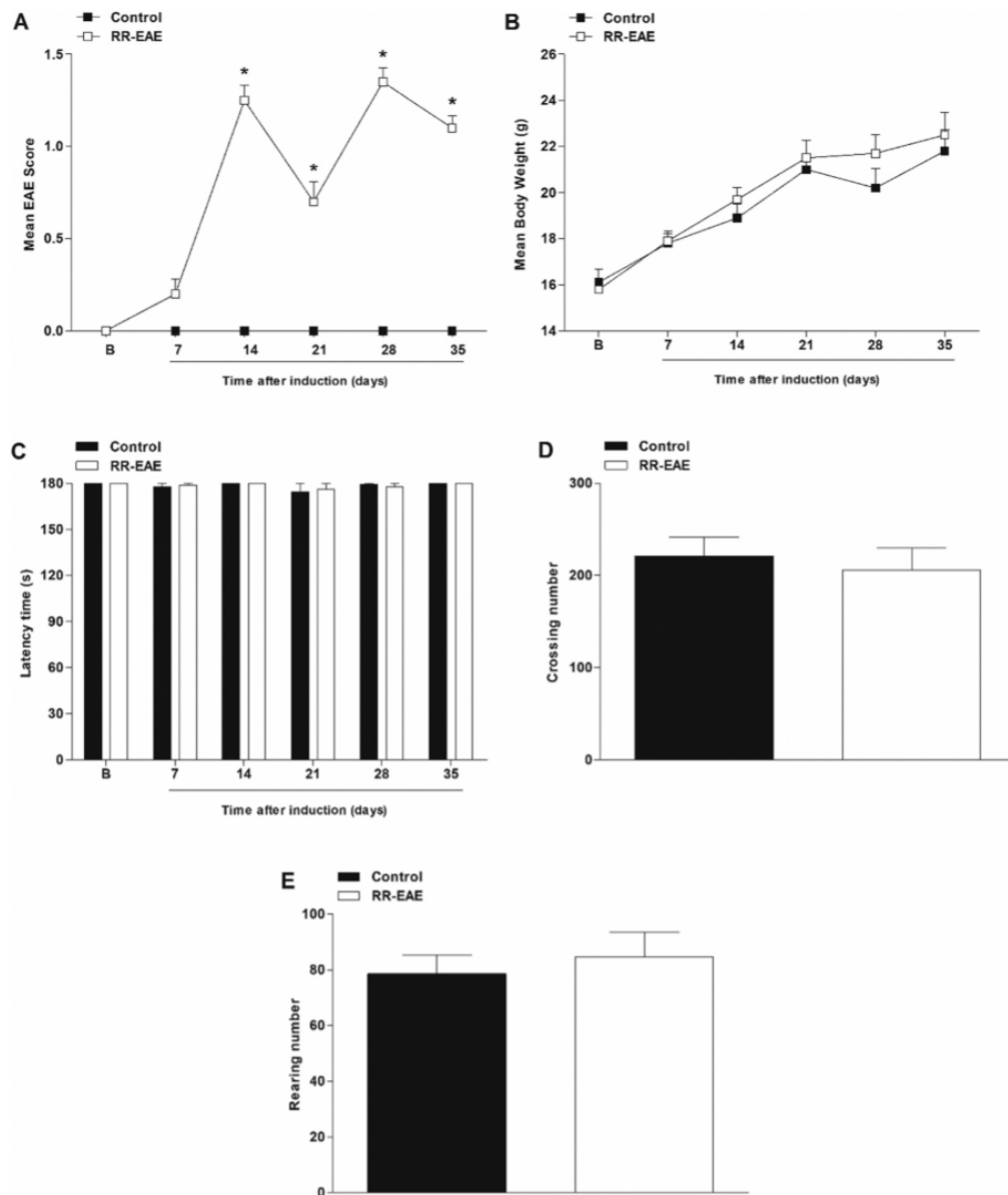


Fig. 1. The relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) caused clinical score changes without inducing locomotor or body weight alteration. (A) Measurement of clinical score, (B) weight of animals, (C) latency time for fall measured by rotarod test for 7 to 35 days post-induction (p.i.) of RR-EAE induced mice. (D) Crossing and (E) rearing numbers were observed in the open field test at day 35 p.i. Baseline measurements (described as B in the graph) were taken before induction. Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 8$). * $P < .05$, when compared to the control group or baseline values [Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test (in A, B and C) or Student's t -test (D and E)].

3.7. The intrathecal administration of TRPA1 antisense, TRPA1 antagonist and antioxidants was able to reduce mechanical and cold allodynia in RR-EAE

We demonstrated the antiallodynic effect of TRPA1 antisense oligonucleotides (AS ODN) in RR-EAE induced-mice. AS ODN showed antiallodynic effect in mechanical allodynia with I_{max} of $94 \pm 6\%$ (Fig. 7A) and cold allodynia with I_{max} of $81 \pm 6\%$ (Fig. 7B) three

repeated days of administration (day peak 35) when compared to mismatch oligonucleotide (MM ODN). Moreover, the intrathecal administration of HC-030031 presented antiallodynic effect at 0.5 and 1 h after administration. HC-030031 reduced the mechanical allodynia (Fig. 7C) with an I_{max} value of $60 \pm 8\%$, and for cold allodynia (Fig. 7D) the I_{max} value was $88 \pm 2\%$ at 1 h post administration. The α -lipoic acid (Fig. 7E) and apocynin (Fig. 7G) i.t. administration also reduced the mechanical allodynia at 0.5 and 1 h. The I_{max} value of α -

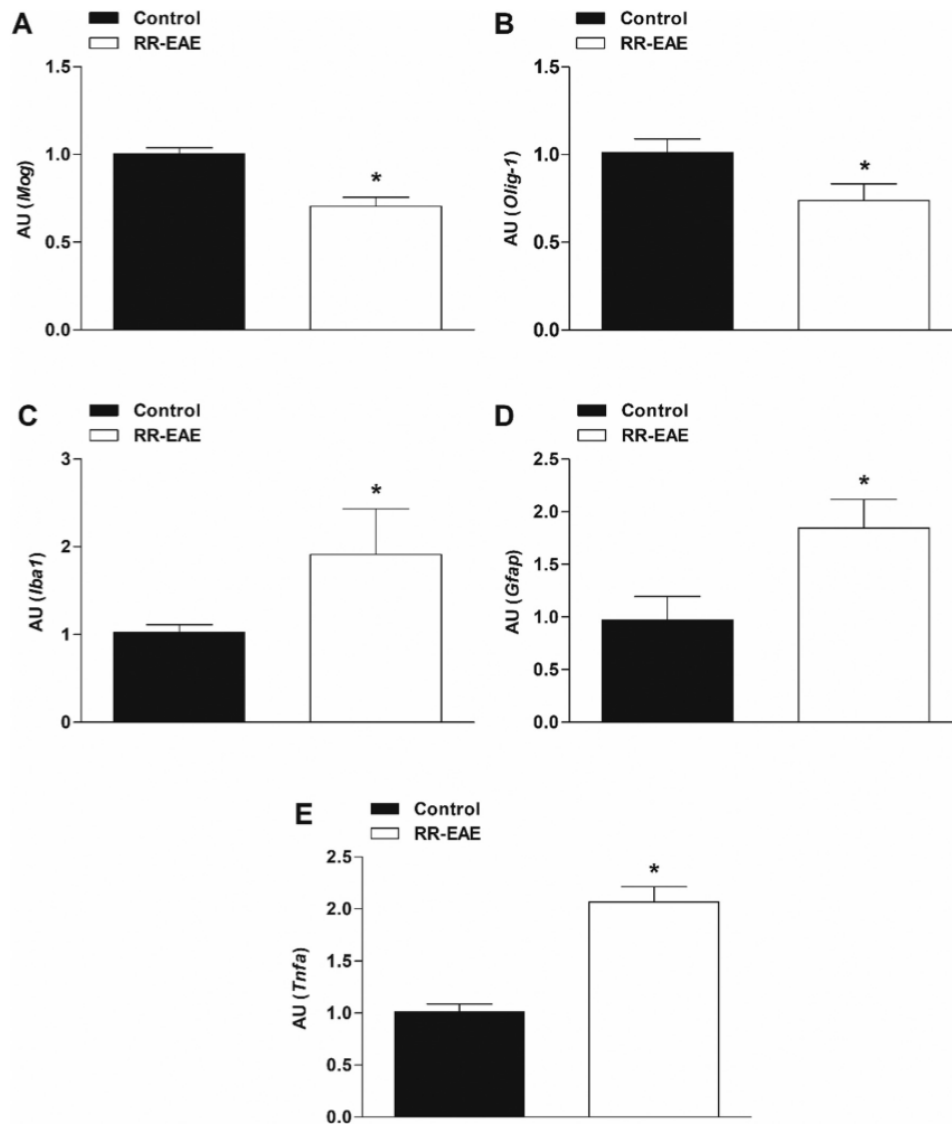


Fig. 2. The relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) caused demyelinating process, microglial and astrocyte activation, and proinflammatory cytokine production. (A) *Mog* (Myelin-oligodendrocyte glycoprotein), (B) *Olig1* (Oligodendrocyte factor 1), (C) *Iba1* (Ionized calcium-binding adapter molecule-1), (D) *Gfap* (Glial fibrillary acidic protein) and (E) *Tnfa* (Tumor Necrose Factor- α) levels in spinal cord tissue. Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 5$) in the graphs. * $P < .05$, when compared to the control group [nonparametric Student's t-test].

lipoic acid was $96 \pm 5\%$ and apocynin was $61 \pm 8\%$ at 1 h after treatment. For cold allodynia, α -lipoic acid (Fig. 7F) showed antinociceptive effect at 0.5 and 1 h after administration, and I_{max} value at 1 h was $87 \pm 3\%$. Finally, apocynin (Fig. 7H) showed antiallodynic effect at 0.5 and 1 h after treatment and I_{max} value was $52 \pm 8\%$ (1 h after treatment).

4. Discussion

Sensory changes have been reported by patients in the early phases of RRMS and remain unaltered by clinical disease course (Khan et al., 2015). The development of central neuropathic pain in RRMS affects

the quality of life of patients, and current treatments are ineffective or have adverse effects (Foley et al., 2013; Khan et al., 2014). Neuropathic pain is a significant symptom in RRMS, presenting mechanical and cold allodynia, described as an exaggerated response to non-noxious stimuli and an important clinical problem (Bernardes and Oliveira, 2017). In the present study, we investigated TRPA1 involvement in a model of central neuropathic pain caused by RR-EAE model. We have shown the development of RR-EAE clinical signs of disease without motor impairment, and the presence of the characteristic alterations of RRMS, such as a decrease of the myelin markers, microglia and astrocyte activation, and inflammatory process. We have also demonstrated the development of nociceptive behaviors and increase of the oxidative

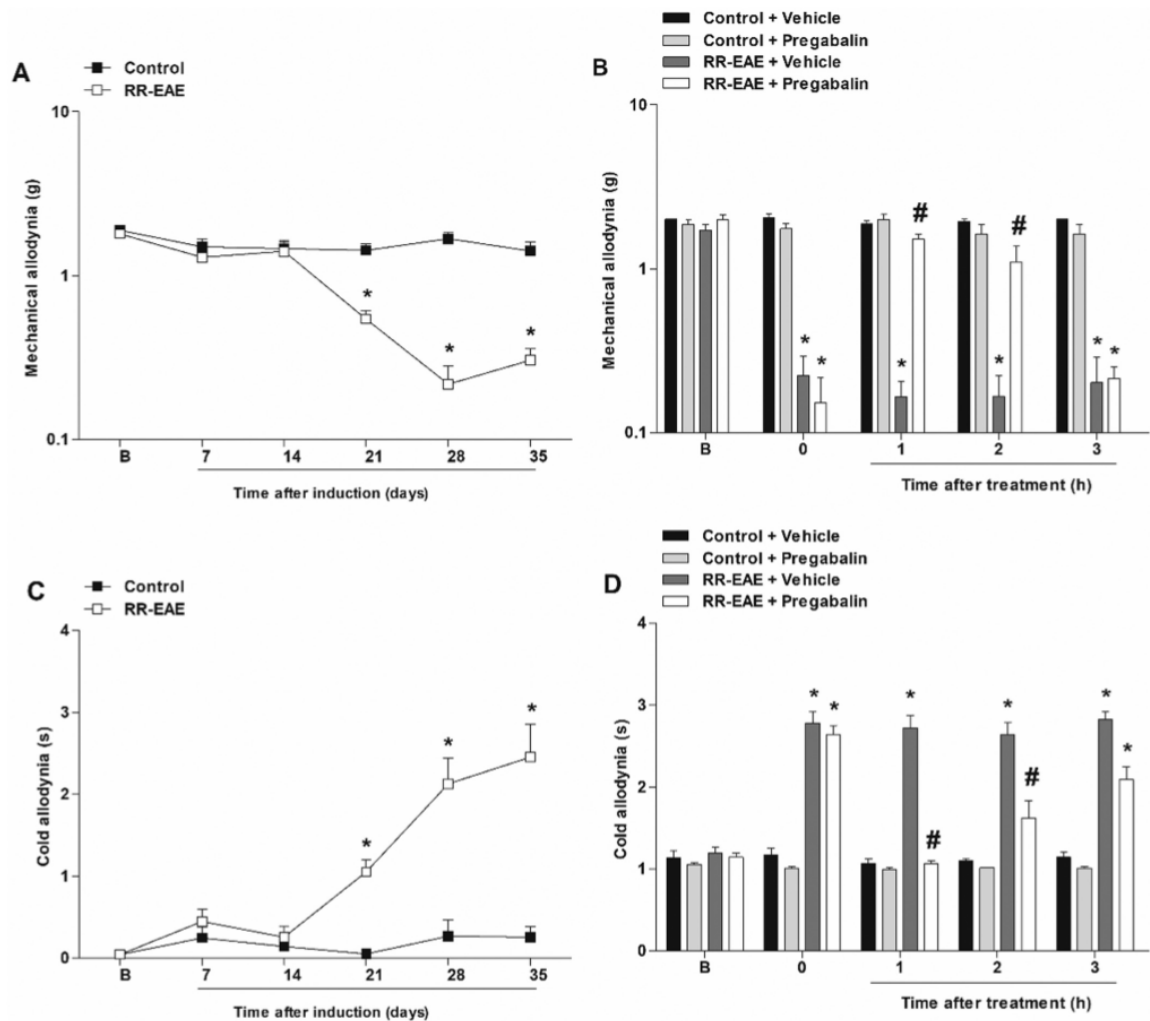


Fig. 3. Relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) in mice caused mechanical and cold allodynia, and pregabalin administration reduced the hypersensitivity in this model. (A) Mechanical and (C) cold allodynia were detected on day 21 to 35 days after RR-EAE induction, and baseline measurements (described as B in the graph) were observed before induction. The administration of pregabalin (60 mg/kg, intragastric, i.g.) at day 35 p.i. (post-induction) reduced the nociception generated by RR-EAE. (B, D) Change in mechanical threshold was determined using von Frey filaments. Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 8$). * $P < .05$, when compared to the control group or baseline values; and # $P < .05$ when compared to RR-EAE vehicle-treated group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

stress parameters. Moreover, the antinociceptive effect of TRPA1 antagonists, TRPA1 antisense and antioxidants in RR-EAE induced mice treated by oral or intrathecal routes was demonstrated. Accordingly, we observed that TRPA1 activation in the spinal cord is relevant for the development of the nociception in this model of RR-EAE.

RRMS pathophysiology consists in oligodendrocytes death, inflammation and demyelination, culminating in an axonal loss that can increase the probability of developing pain (Bölcskei et al., 2018; Dendrou et al., 2015; Wang et al., 2017). Different types of MS animal models exist in the MS research field, but the most commonly used is experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Bjelobaba et al., 2018). According to the hypothesis that there may be environmental factors, such as viral infections, it has been described that toxin-induced models using ethidium bromide (EtBr) and lysolecithin, or systemically administered toxins, such as cuprizone, could also be used as MS

models. These toxin-induced models are the first choice when the main purpose is to investigate a demyelinating process without immune activity (Woodruff and Franklin, 1999). However, EAE was able to imitate histopathological and immune features of MS and can reproduce the different phases of this disease. To induce EAE, different antigens can be used, such as myelin proteolipid protein (PLP) and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) (Bjelobaba et al., 2018). The EAE model with PLP is an RRMS model, but it is necessary to use old SJL mice because they are more susceptible to the development of demyelination lesions with this antigen. Another disadvantage is the absence of demyelination at dorsal root entry (Chalk et al., 1994; Rasmussen et al., 2007). Using MOG₃₅₋₅₅ as antigen and complete Freund's adjuvant (CFA), it is possible to reproduce a progressive MS model; however, the animals show severe motor impairment that can impair the measurements of nociception (Khan et al., 2014; Olechowski

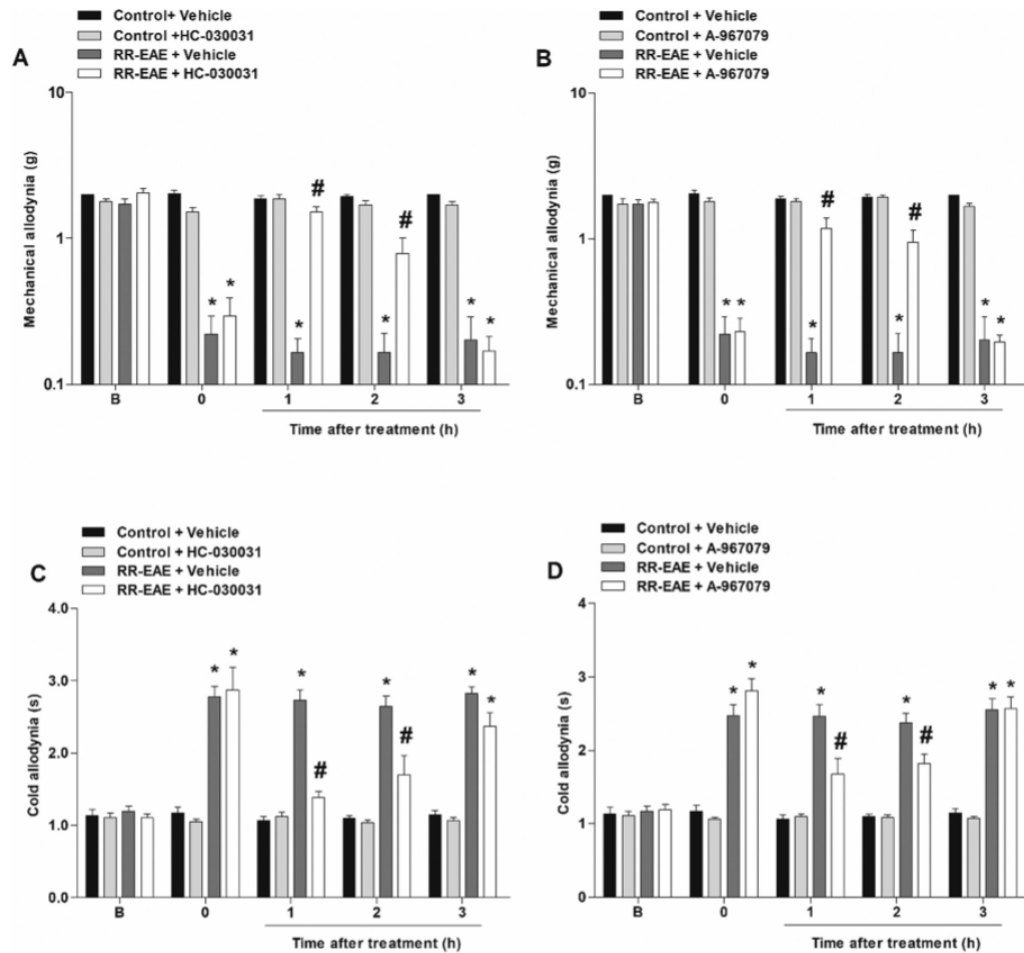


Fig. 4. The administration of TRPA1 antagonists reduces nociception caused by relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) in mice. Mechanical (A, B) and cold (C, D) allodynia measurement. Drugs were administered on day 35 post-induction (p.i.), and the antinociceptive effects were observed at 1 to 3 h after intragastric (i.g.) treatment with TRPA1 antagonists (HC-030031, 100 mg/kg; A-967079 100 mg/kg). Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 8$). * $P < .05$, when compared to the group or baseline values; # $P < .05$, when compared to the RR-EAE vehicle-treated group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

et al., 2013). Therefore, we chose the RRMS optimized model that induces central neuropathic pain in C57BL/6 female mice using Quil A as adjuvant (Khan et al., 2014). For this model, only mechanical allodynia has been evaluated so far concerning nociception development. However, patients also demonstrate the presence of cold allodynia (Osterberg and Boivie, 2010), and in our study we observed this hypersensitivity, as well as the presence of mechanical allodynia. Previously, using this model of RR-EAE, the antiallodynic effect of different compounds used in the clinic to treat pain has been demonstrated (morphine, gabapentin, and amitriptyline), as well as the antinociceptive effect of the antioxidant α -lipoic acid (Khan et al., 2015). Thus, in our study we also tested a common used analgesic in the treatment of neuropathic pain in MS (Solaro and Messner Uccelli, 2011), pregabalin, and showed for the first time the antinociceptive effect of this compound in this model of RR-EAE.

The development of RRMS animal models is extremely important to elucidate the mechanisms and pathogenic pathways, because more than 85% of patients with MS present the relapsing-remitting form of MS (Heidari et al., 2019). This model was previously optimized and it

demonstrated that the central neuropathic pain behaviors in rodent models are associated with pathobiological mechanisms in sensory neurons in the dorsal horn of the spinal cord (Khan et al., 2015; Khan et al., 2014). Our results agree with this RRMS-neuropathic pain model, demonstrating the development of the clinical disease score without severe motor deficits. Similar to other studies, we can demonstrate clinical signs that mimic RRMS, showing scores between 0.5 (remission phase) and 1.5 (relapsing phase), with the first peak of the relapsing phase 14 days post-induction (Khan et al., 2014; Peiris et al., 2007). At 14 days p.i. the RR-EAE animals presented the mean of score 1.25 and at the day 21 p.i. it was 0.7, thus as described before animals have scores that range above 1 or less than 1 showing the relapsing-remitting feature of this model. In addition, during all the experiments, the animals did not show significant body weight loss or locomotor abnormalities.

Using this model of RR-EAE there are only three papers published relating to neuropathic pain (Khan et al., 2018; Khan et al., 2015; Khan et al., 2014). Hence, we decided to evaluate the development of motor alteration, clinical scores, and cold allodynia in our laboratory using

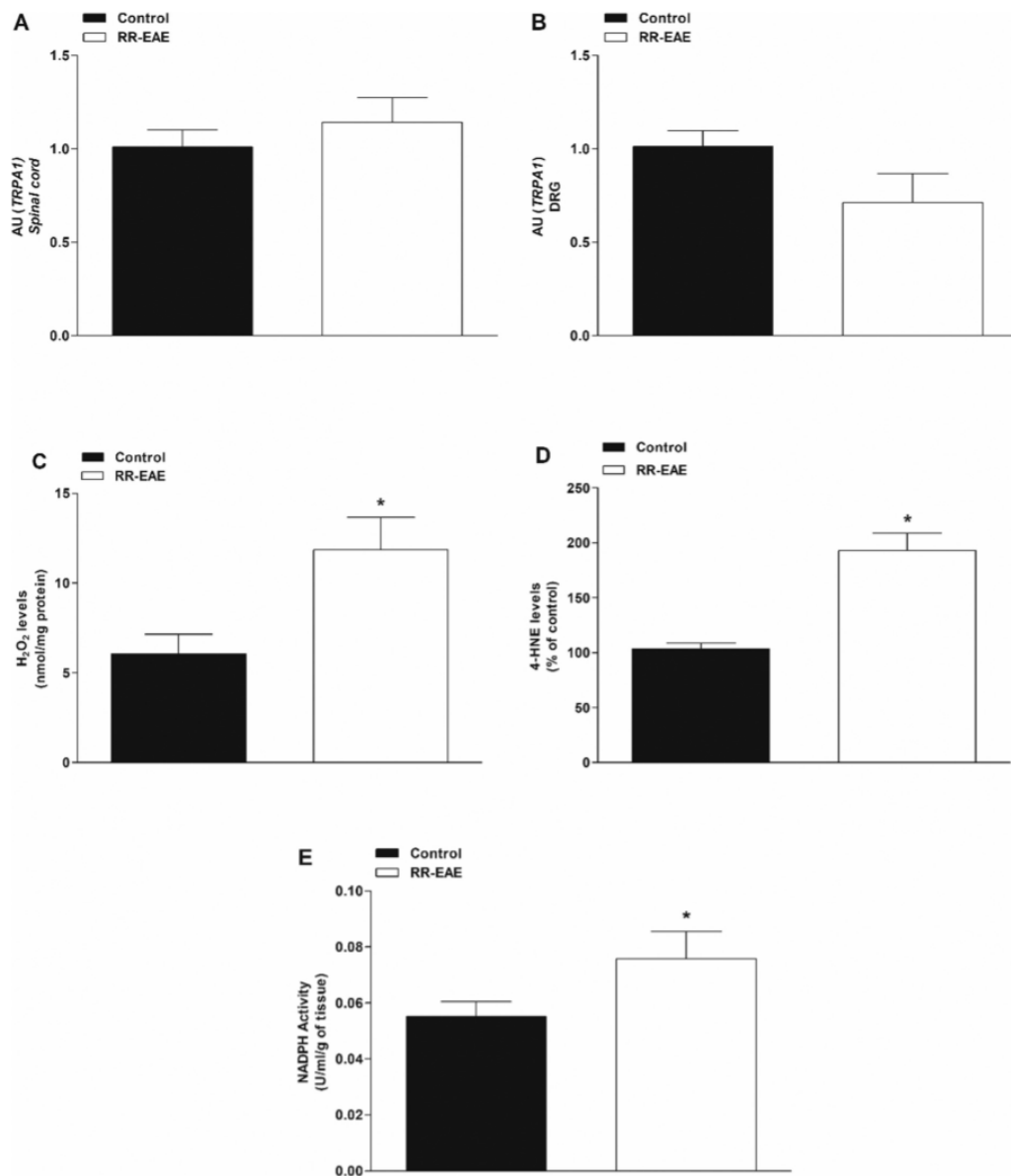


Fig. 5. TRPA1 agonist production and NADPH activity were increased in the spinal cord of relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) induced mice, but there was no increase in *Trpa1* RNA expression levels. *Trpa1* RNA expression by RT-qPCR in spinal cord (A) and DRG (B) samples obtained 35 days after RR-EAE induction. Measurement of hydrogen peroxide (H₂O₂), (C) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) levels (D) or NADPH oxidase activity (E) in spinal cord samples 35 days after RR-EAE induction. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (RT-qPCR $n = 4$; H₂O₂ $n = 9$; 4-HNE = 4; NADPH oxidase $n = 10$). * $P < .05$, when compared to the control group [nonparametric *t*-test (A and B) and parametric Student's *t*-test (C, D and E)].

this model of RR-EAE. In the reference, they performed the analysis of gait using the Catwalk[™]XT software, and only observe the development of mechanical allodynia (Khan et al., 2014). Although, we assessed the spontaneous or forced locomotor activity with the open field test and rotarod performance test, respectively, and we also showed the absence of motor impairment. Also, we detected the presence of mechanical and cold allodynia using this model of RR-EAE.

MOG is a myelin component expressed in CNS responsible for the myelination process and oligodendrocyte maturation (Peschl et al.,

2017). The decrease of this marker in an RR-EAE model has been previously shown by an immunohistochemical study (Khan et al., 2014). The OLIG-1 is a transcription factor involved in myelinogenesis and myelin repair, which is reduced in the spinal cord in injury models (Othman et al., 2011). Our results agree with these studies, demonstrating reduction on both *Mog* and *Olig-1* RNA expression levels by RT-qPCR assay and proving that a demyelinating process in an RR-EAE model was happening (Khan et al., 2014; Othman et al., 2011). GFAP has a high specificity for astrocytic damage and seems to be useful as a

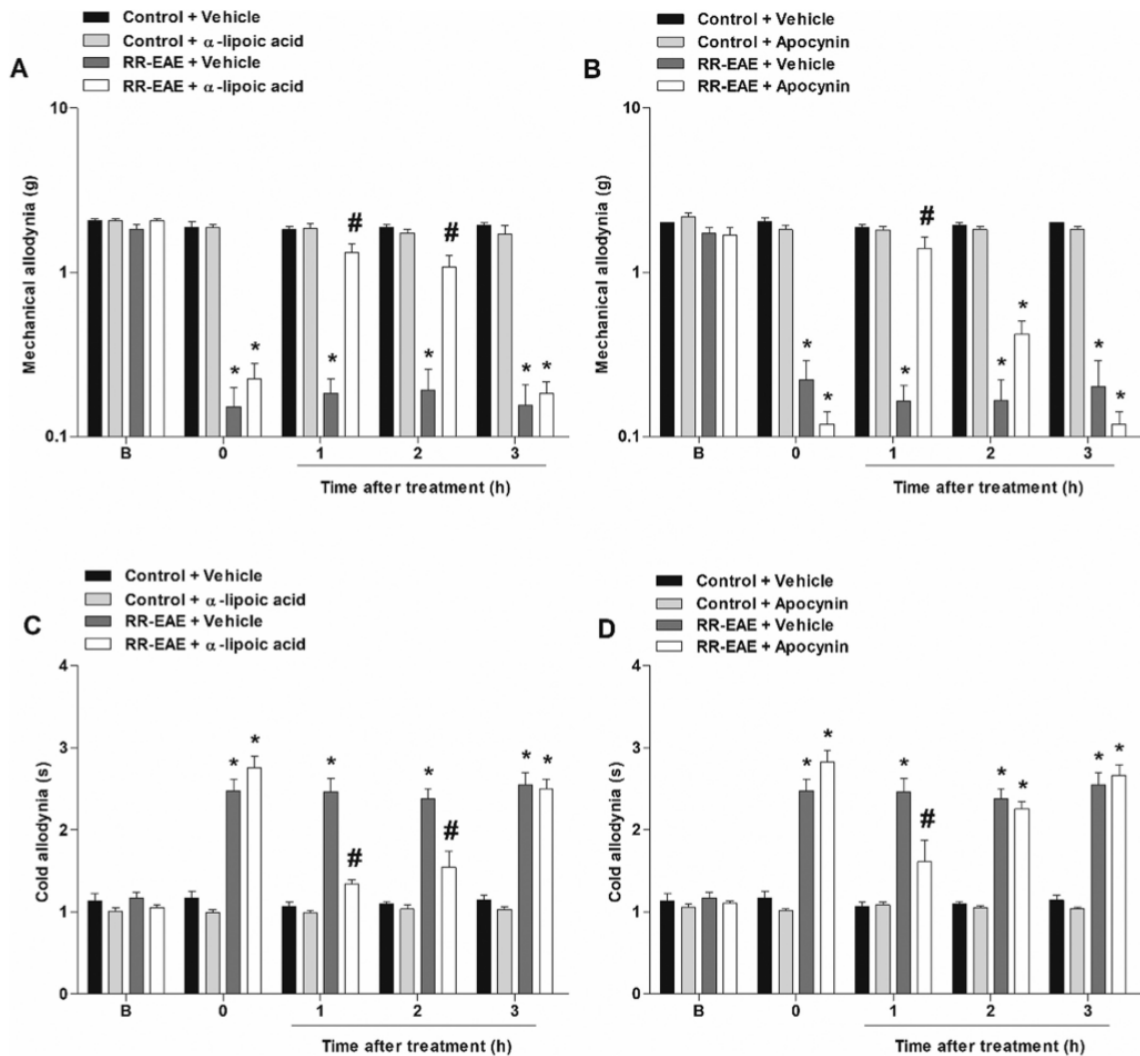
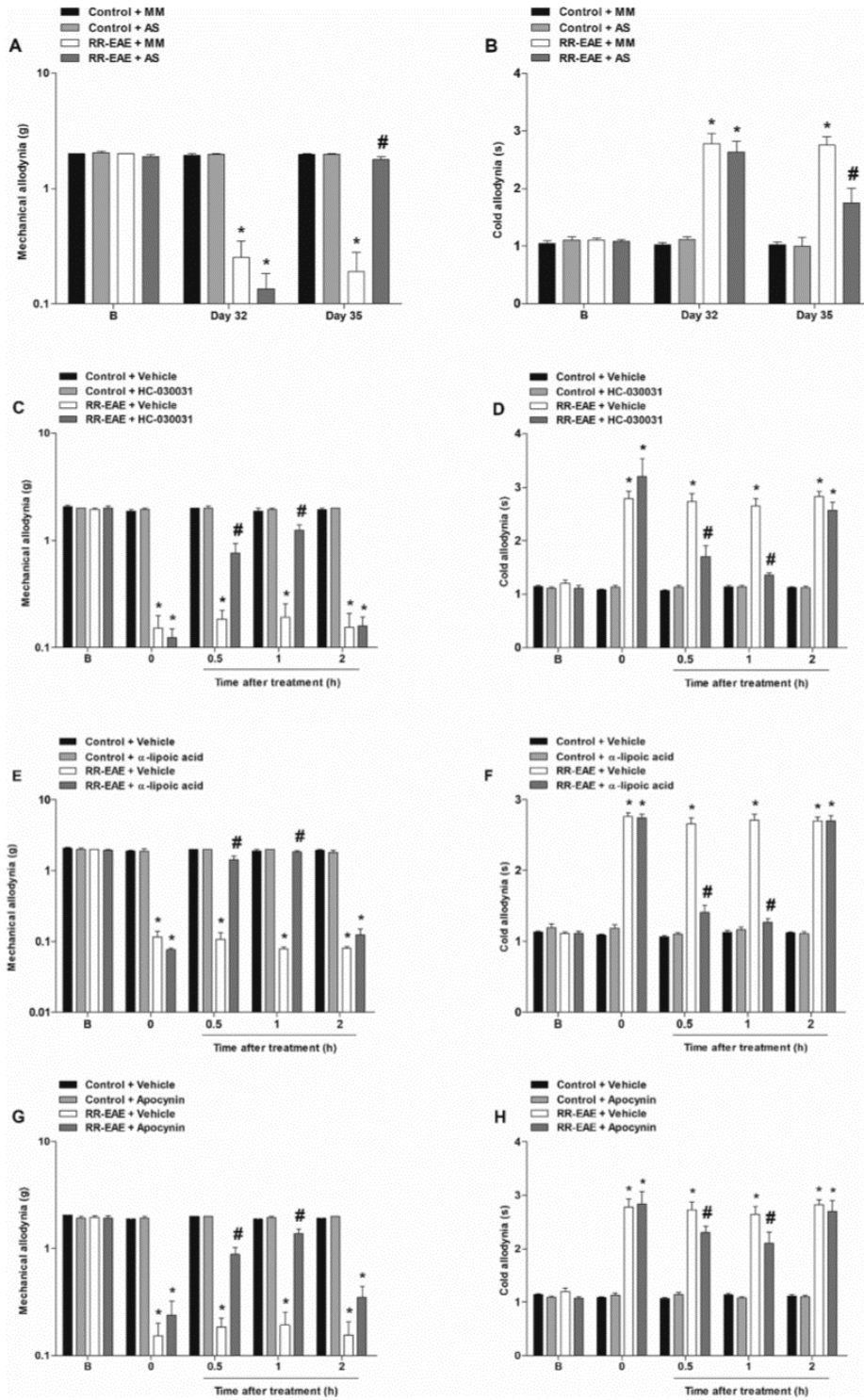


Fig. 6. The administration of α -lipoic acid and apocynin reduces the nociception observed in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) induction in mice. (A,B) Mechanical and (C,D) cold allodynia measurement. The drugs were given on day 35 and antinociceptive effects were observed 1 to 3 h after intragastric (i.g.) treatment with antioxidants (α -lipoic acid or apocynin, 100 mg/kg). Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 8$). * $P < .05$, when compared to the group or baseline values; # $P < .05$, when compared to the group treated with vehicle [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

biomarker during acute inflammation in patients with RRMS (Kassubek et al., 2017). The IBA1 is a protein whose expression is restricted to microglia/macrophages and is useful to demonstrate microglia activation (Ohsawa et al., 2004). An increase of GFAP and IBA-1 was presented in spinal cord of RR-EAE induced mice by immunohistochemical analyses (Khan et al., 2014), and we showed an increase of the RNA expression levels in both markers by RT-PCR. TNF- α is a proinflammatory cytokine and has been linked to MS pathophysiology. It can also be involved in the demyelination process in EAE models (Madsen et al., 2016). We found an increase of RNA expression levels of *Tnfa*, thus confirming the presence of neuroinflammatory process in this model. In the previous studies, it was showed all the histological and immunologic aspects of this model and also optimized the best dose of the reagents used for the induction (Khan et al., 2014). Thus, we showed a possible demyelinating and neuroinflammatory processes

through RT-PCR, which is in agreement with this previous optimized model of neuropathic pain by RR-EAE induction (Khan et al., 2014).

Signs of pain appear in the early phases of RRMS, causing several disabilities in patients (Galea et al., 2015; Motl et al., 2010; Truini et al., 2012). Migraine and central neuropathic pain are the major symptoms, described as mechanical and cold allodynia, similar to the RR-EAE model (Husain et al., 2018; Osterberg and Boivie, 2010). In this study, we confirm the development of mechanical allodynia (von Frey test), as other studies have already described (Khan et al., 2015; Khan et al., 2014; Peiris et al., 2007). Moreover, we showed the presence of cold allodynia (acetone test) in days 21 to 35 after RR-EAE induction, demonstrated in other pain models (Antoniazzi et al., 2019; Trevisan et al., 2013a). This model of RR-EAE has been used previously to demonstrate the development of mechanical allodynia (Heidari et al., 2019; Khan et al., 2014), but in our study we also showed cold



(caption on next page)

Fig. 7. The intrathecal administration of TRPA1 antisense, TRPA1 antagonist and antioxidants was able to reduce mechanical and cold allodynia in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE). TRPA1 oligonucleotides antisense (AS) and mismatch (MM) intrathecal (i.t.) administration effect in mechanical allodynia (A) and cold allodynia (B). The HC-030031 treatment with intrathecal (i.t.) administration on mechanical allodynia (C) and cold allodynia (D). The intrathecal (i.t.) administration of α -lipoic acid on (E) mechanical allodynia and (F) cold allodynia. The intrathecal (i.t.) effect of apocynin on (G) mechanical allodynia and (H) cold allodynia. Baseline values were measured before induction of the RR-EAE model. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8). * P < .05, when compared to the TRPA1 antisense oligonucleotides, HC-030031 or antioxidants group # P < .05, when compared to the group treated with vehicle RR-EAE [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

allodynia in female mice. We did not evaluate the temperature reactions on TRPA1 knockout mice, but it seems that there is no difference related to gender in this type of strain (Karashima et al., 2009). Furthermore, differently to drugs targeting TRPV1 channels, TRPA1 antagonists do not evoke side effects that involve the body temperature regulation (Weyer-Menkhoff and Lötsch, 2018).

Pregabalin is an anticonvulsant that presents the structural analogue of gabapentin and is considered a first line in the treatment of neuropathic pain in MS (Thompson et al., 2018). After we confirmed the development of allodynia in the RR-EAE model, pregabalin was used as a positive control treatment. Our results demonstrated the pregabalin antiallodynic effect in mechanical and cold nociception tests. The antinociceptive effect of gabapentin in the model of RR-EAE used in our study has been described previously (Daneshdoust et al., 2017). However, gamma-aminobutyric acid (GABA) analog drugs, such as gabapentin and pregabalin, are not very effective in the treatment of neuropathic pain in MS, and commonly cause intolerable adverse effects (Solaro et al., 2005). Therefore, it is essential to search for new mechanisms to treat neuropathic pain in MS. In this context, the activation of TRPA1-expressed Schwann cells is involved in neuroinflammation, oxidative stress and allodynia in a model of chronic pain (De Logu et al., 2017). Also, TRPA1 expressed on astrocytes plays a role in the demyelinating process (Sághy et al., 2016). Thus, TRPA1 is an interesting target for the central neuropathic pain in MS.

During the last years, diverse studies showed the role of TRPs channels in the activation of the immune cells in different EAE models. The transient receptor vanilloid 1 (TRPV1) showed the role in cytokines release during the EAE induction (Bassi et al., 2019; Paltser et al., 2013). Moreover, TRPV1 exerted different roles in pain behaviors and neuroinflammation depending on the time course of EAE immunization (Musumeci et al., 2011). Besides, the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) knockout mice presented a decrease in neuroinflammation process caused by EAE (Melzer et al., 2012; So et al., 2015). Likewise, the deletion of transient potential reception melastatin 4 (TRPM4) in C57BL/6 mouse was able to attenuate the EAE progression in vivo and in vitro experiments (Bianchi et al., 2018; Makar et al., 2015; Schattling et al., 2012). However, the role of TRPA1 in neuroinflammation and nociception in a model of EAE was not detected before. Recently, it was described that TRPA1 deletion was able to attenuate the demyelinating process in a model of MS caused by cuprizone injection (Bölcskei et al., 2018; Kriszta et al., 2019; Sághy et al., 2016).

The role of TRPA1 activation was described in the development of mechanical and cold allodynia signs in diverse pain models, such as cancer pain (Antoniazzi et al., 2019) and neuropathic pain (Materazzi et al., 2012; Nassini et al., 2011; Rigo et al., 2013). Moreover, TRPA1 inhibition was reported to attenuate the nociception in these models through the oral administration of antagonists. In this manner, we tested two selective antagonists, HC-030031 and A-967079, and both demonstrated antinociceptive effects after oral administration in mechanical and cold assessment. We evaluate the antinociceptive effect of the TRPA1 antagonists only in the nociception peak day (day 35 RR-EAE model post-induction). For the first time, our results suggest the role of TRPA1 during the nociception process in a central neuropathic pain model.

In this manner, the sub-products of oxidative stress can constantly activate a mitochondrial signal to generate reactive species in MS, and

they can sustain pathways of chronic axonal degeneration (Aarts et al., 2003; Haider et al., 2011). One of the pathways would be through the increase of permeability of endothelial cells in CNS that allow the phagocytosis of oligodendrocytes, the main cell producing myelin in neurons (Bölcskei et al., 2018; Gray et al., 2008). Some of these sub-products, such as H₂O₂ and 4-HNE, were able to activate the TRPA1 channel and may be associated with nociception signs in different types of pain models (Antoniazzi et al., 2019; De Logu et al., 2017; Trevisan et al., 2016). The α -lipoic acid was related to attenuation of mechanical allodynia in cancer and RR-EAE model (Antoniazzi et al., 2019; Khan et al., 2015). The NADPH oxidase is a major generator of reactive oxygen species that contributes to chronic neurodegenerative disorders such as multiple sclerosis (Ma et al., 2017). In RR-EAE induced mice, the brain and spinal cord exhibit increased NADPH oxidase activity (Ma et al., 2017). In our results, we showed the increased of H₂O₂ and 4-HNE levels, as well as the enhancement of NADPH oxidase activity in spinal cord samples.

The NADPH oxidase inhibitor, apocynin, reduced mechanical allodynia in spinal cord injury (Hassler et al., 2019) and diabetic neuropathic pain (Olukman et al., 2018) in rats, and trigeminal neuropathic pain in mice (Trevisan et al., 2016). Apocynin was also shown to have a leading role in the reduction of white matter damage in progressive-EAE mice, but did not show results regarding the development of allodynia (Choi et al., 2015). In our results, we found the antiallodynic effects with the administration of α -lipoic acid and apocynin in the mechanical and cold allodynia tests. In the same way as for TRPA1 antagonist treatment, we evaluated the acute i.g. or i.t. administration of α -lipoic acid and apocynin (100 mg/kg or 10 μ g/site) and detected their transient effect. All these results suggest that a role of reactive species in the neuroinflammatory process of MS may lead to TRPA1 channel activation and demonstrate the sensory changes as mechanical and cold allodynia.

Unfortunately, there are not yet many studies that show a randomized trial about MS patients and sensory alterations. Moreover, TRPA1 is related as a cold noxious sensor, and its activation can lead to the development of cold allodynia in different pain models, and hypersensitivity to cold is usually reduced with TRPA1 antagonist treatment in chronic pain models (Antoniazzi et al., 2019; De Logu et al., 2017; Trevisan et al., 2016; Trevisan et al., 2013b). In our study, treatment with both TRPA1 antagonists showed a similar antinociceptive effect from 1 to 2 h after administration to mechanical and cold allodynia. However, the antioxidant treatments also presented antiallodynic effect, but apocynin showed the antinociceptive effect only 1 h after i.g. administration. Possible, the observed effect of apocynin only at 1 h after i.g. administration could be caused by its rapid glycosylation and transport to blood and other organs (Chandasana et al., 2015). However, when apocynin was administered i.t. it showed effect after 0.5 and 1 h after injection like the other compounds tested. Finally, these compounds could act in the central and peripheral pathways, as we show in different administration forms and in agreement with other studies (De Logu et al., 2017; Nassini et al., 2014; Trevisan et al., 2016).

The intrathecal administration of antioxidants is relevant because we found oxidative stress alterations in the spinal cord in an RR-EAE model. In agreement of our hypothesis, HC-0300, apocynin and α -lipoic acid showed antinociceptive effect after intrathecal administration. Finally, AS ODN TRPA1 intrathecal administration is one tool for the

investigation of the involvement of this receptor in the nociceptive behaviors in different pain models (Antoniazzi et al., 2019; De Logu et al., 2017). Here, in agreement with previous studies, we demonstrated that the oligonucleotides antisense of TRPA1 can increase the withdrawal threshold in the von Frey test and decrease the nociception time in the acetone test in an RR-EAE induced group.

5. Conclusions

MS-patients in relapsing phases have described sensory alterations, such as cold and mechanical allodynia. The elucidation of the pain mechanisms involved during RRMS is extremely important, in order to find an approach for its treatment. Therefore, in the present study, we showed the development of RR-EAE model induction without motor impairment, and the development of nociception behaviors such as mechanical and cold allodynia. Like in RRMS, we showed alterations in myelin markers, microglia and astrocyte activation, and the presence of inflammatory process and products of oxidative stress. The anti-nociceptive effect of TRPA1 antagonists, TRPA1 antisense and anti-oxidants were detected. For the first time, our study suggests a relationship between TRPA1 and the development of mechanical and cold allodynia in a mouse model of RR-EAE induced central neuropathic pain. These findings demonstrate that TRPA1 appears to be a suitable therapeutic target for the development of new drugs in the treatment of pain symptoms in RRMS patients.

Role of the funding source

The funding source was not involved in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Author contributions

All the authors discussed the results, commented on the manuscript, and approved this final version.

1) Substantial contributions to conception and design, data acquisition, analysis, and interpretation: Diéssica Padilha Dalenogare, Maria Carolina Theisen, Diulle Spat Peres, Maria Fernanda Pessano Fialho, Débora Denardin Lückemeyer, Caren Tatiane de David Antoniazzi, Sabrina Qader Kudsi, Marcella de Amorim Ferreira, Camila Ritter, Juliano Ferreira, Sara Marchesan Oliveira, Gabriela Trevisan.

2) Drafting and critically revising the article for important intellectual content: Diéssica Padilha Dalenogare, Maria Carolina Theisen, Diulle Spat Peres, Maria Fernanda Pessano Fialho, Débora Denardin Lückemeyer, Caren Tatiane de David Antoniazzi, Sabrina Qader Kudsi, Marcella de Amorim Ferreira, Camila Ritter, Juliano Ferreira, Sara Marchesan Oliveira, Gabriela Trevisan.

3) Final article approval: Diéssica Padilha Dalenogare, Maria Carolina Theisen, Diulle Spat Peres, Maria Fernanda Pessano Fialho, Débora Denardin Lückemeyer, Caren Tatiane de David Antoniazzi, Sabrina Qader Kudsi, Marcella de Amorim Ferreira, Camila Ritter, Juliano Ferreira, Sara Marchesan Oliveira, Gabriela Trevisan.

4) Acquisition of funding and general supervision of the research group: Juliano Ferreira, Sara Marchesan Oliveira, Gabriela Trevisan.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are also acknowledged. Fellowship from the Diéssica Padilha Dalenogare from the Coordenação de Aperfeiçoamento

de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [process # 88882.428089/2019-01]. Gabriela Trevisan is recipient of a fellowship from CNPq [process #306576/2017-1], L'ORÉAL - ABC - UNESCO Para Mulheres na Ciência, 2016 and Prêmio Capes de Teses - Ciências Biológicas II, CAPES, 2014 [process #23038.006930/2014/59].

References

- Aarts, M., Iihara, K., Wei, W.-L., Xiong, Z.-G., Arundine, M., Cerwinski, W., MacDonald, J.F., Tymianski, M., 2003. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 115, 863–877.
- Antoniazzi, C.T.D.D., Nassini, R., Rigo, F.K., Milioli, A.M., Bellinaso, F., Camponogara, C., Silva, C.R., de Almeida, A.S., Rossato, M.F., De Logu, F., Oliveira, S.M., Cunha, T.M., Geppetti, P., Ferreira, J., Trevisan, G., 2019. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. *Int. J. Cancer* 144, 355–365. <https://doi.org/10.1002/ijc.31911>.
- Bassi, M.S., Gentile, A., Iezzi, E., Zagaglia, S., Musella, A., Simonelli, L., Gilio, L., Furlan, R., Finardi, A., Marfia, G.A., Guadalupi, L., Bullitta, S., Mandolesi, G., Centonze, D., Buttari, F., 2019. Transient receptor potential vanilloid 1 modulates central inflammation in multiple sclerosis. *Front. Neurol.* 10, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00030>.
- Bernardes, D., Oliveira, A.L.R., 2017. Comprehensive catwalk gait analysis in a chronic model of multiple sclerosis subjected to treadmill exercise training. *BMC Neurol.* 17, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12883-017-0941-z>.
- Bianchi, B., Smith, P.A., Abriel, H., 2018. The ion channel TRPM4 in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and in a model of glutamate-induced neuronal degeneration. *Mol. Brain* 11, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0385-4>.
- Bjelobaba, L., Begovic-Kupresanin, V., Pekovic, S., Lavrnja, I., 2018. Animal models of multiple sclerosis: focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 96, 1021–1042. <https://doi.org/10.1002/jnr.24224>.
- Bölcskei, K., Kriszta, G., Ságthy, É., Payrits, M., Sipos, É., Vranesics, A., Berente, Z., Ábrahám, H., Ács, P., Komoly, S., Pintér, E., 2018. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *J. Neuroimmunol.* 320, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.03.020>.
- Chalk, J.B., McCombe, P.A., Smith, R., Pender, M.P., 1994. Clinical and histological findings in proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the Lewis rat. Distribution of demyelination differs from that in EAE induced by other antigens. *J. Neurol. Sci.* 123, 154–161. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(94\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0022-510x(94)90218-6).
- Chandasana, H., Chhonker, Y.S., Bala, V., Prasad, Y.D., Chaitanya, T.K., Sharma, V.L., Bhatta, R.S., 2015. Pharmacokinetic, bioavailability, metabolism and plasma protein binding evaluation of NADPH-oxidase inhibitor apocynin using LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 985, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.025>.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).
- Choi, B.Y., Kim, J.H., Kho, A.R., Kim, I.Y., Lee, S.H., Lee, B.E., Choi, E., Sohn, M., Stevenson, M., Chung, T.N., Kauppinen, T.M., Suh, S.W., 2015. Inhibition of NADPH oxidase activation reduces EAE-induced white matter damage in mice. *J. Neuroinflammation* 12, 104. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0325-5>.
- Brun da, E.S., Becker, G., Fialho, M.F.P., Casoti, R., Trevisan, G., Oliveira, S.M., 2019. TRPA1 involvement in analgesia induced by Tabernaemontana catharinensis ethyl acetate fraction in mice. *Phytomedicine* 54, 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.201>.
- Daneshdoust, D., Khalili-Fomeshi, M., Ghasemi-Kasman, M., Ghorbanian, D., Hashemian, M., Gholami, M., Moghadamnia, A., Shojaei, A., 2017. Pregabalin enhances myelin repair and attenuates glial activation in lysolecithin-induced demyelination model of rat optic chiasm. *Neuroscience* 344, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.037>.
- De Logu, F., Nassini, R., Materazzi, S., Carvalho Gonçalves, M., Nosi, D., Rossi Degl'Innocenti, D., Marone, I.M., Ferreira, J., Li Puma, S., Benemei, S., Trevisan, G., Souza Monteiro Araújo de, D., Patacchini, R., Bunnett, N.W., Geppetti, P., 2017. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nat. Commun.* 8, 1887. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01739-2>.
- Dendrou, C.A., Fugger, L., Friese, M.A., 2015. Immunopathology of MS. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri3871>.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441–462. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301>.
- Foley, P.L., Vesterinen, H.M., Laird, B.J., Sena, E.S., Colvin, L.A., Chandran, S., MacLeod, M.R., Fallon, M.T., 2013. Prevalence and natural history of pain in adults with multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Pain* 154, 632–642. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.12.002>.
- Galea, I., Ward-Abel, N., Heesen, C., 2015. Relapse in multiple sclerosis. *BMJ* 350, h1765. <https://doi.org/10.1136/bmj.h1765>.
- Gray, E., Thomas, T.L., Betmouni, S., Scolding, N., Love, S., 2008. Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 18, 86–95. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00110.x>.
- Haider, L., Fischer, M.T., Frischer, J.M., Bauer, J., Hofberger, R., Botond, G., Esterbauer, H., Binder, C.J., Witztum, J.L., Lassmann, H., 2011. Oxidative damage in multiple

- sclerosis lesions. *Brain* 134, 1914–1924. <https://doi.org/10.1093/brain/awr128>.
- Hassler, S.N., Ahmad, F.B., Burgos-Vega, C.C., Boitano, S., Vagner, J., Price, T.J., Dussor, G., 2019. Protease activated receptor 2 (PAR2) activation causes migraine-like pain behaviors in mice. *Cephalalgia* 39, 111–122. <https://doi.org/10.1177/0333102418779548>.
- Heidari, A.R., Boroumand-Noughabi, S., Nosratabadi, R., Lavi Arab, F., Tabasi, N., Rastin, M., Mahmoudi, M., 2019. Acylated and deacylated quillaja saponin-21 adjuvants have opposite roles when utilized for immunization of C57BL/6 mice model with MOG 35-55 peptide. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 29, 68–82. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.01.025>.
- Hewitt, E., Pitcher, T., Rizoska, B., Tunblad, K., Henderson, I., Sahlberg, B.-L., Grabowska, U., Classon, B., Edenius, C., Malcangio, M., Lindström, E., 2016. Selective Cathepsin S inhibition with MIV-247 attenuates mechanical allodynia and enhances the anti-allodynic effects of gabapentin and pregabalin in a mouse model of neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 358, 387–396. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.232926>.
- Husain, F., Pardo, G., Rabadi, M., 2018. Headache and its management in patients with multiple sclerosis. *Curr. Treat. Options Neurol.* 20. <https://doi.org/10.1007/s11940-018-0495-4>.
- Hylden, J.L., Wilcox, G.L., 1980. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* 67, 313–316.
- Kalincik, T., 2015. Multiple sclerosis relapses: epidemiology, Outcomes and management. A systematic review. *Neuroepidemiology* 44, 199–214. <https://doi.org/10.1159/000382130>.
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B., Voets, T., 2009. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1273–1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808487106>.
- Kassubek, R., Gorges, M., Schocke, M., Hagenston, V.A.M., Huss, A., Ludolph, A.C., Kassubek, J., Tumani, H., 2017. GFAP in early multiple sclerosis: a biomarker for inflammation. *Neurosci. Lett.* 657, 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.050>.
- Khan, N., Woodruff, T.M., Smith, M.T., 2014. Establishment and characterization of an optimized mouse model of multiple sclerosis-induced neuropathic pain using behavioral, pharmacologic, histologic and immunohistochemical methods. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 126, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.09.003>.
- Khan, N., Gordon, R., Woodruff, T.M., Smith, M.T., 2015. Antiallodynic effects of alpha lipoic acid in an optimized RR-EAE mouse model of MS-neuropathic pain are accompanied by attenuation of upregulated BDNF-TrkB-ERK signaling in the dorsal horn of the spinal cord. *Pharmacol. Res. Perspect.* 3, e00137. <https://doi.org/10.1002/prp2.137>.
- Khan, N., Kuo, A., Brockman, D.A., Cooper, M.A., Smith, M.T., 2018. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome as a potential target for multiple sclerosis induced central neuropathic pain. *Inflammopharmacology* 26, 77–86. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0401-9>.
- Kriszta, G., Nemes, B., Sándor, Z., Ács, P., Komoly, S., Berente, Z., Bölskei, K., Pintér, E., 2019. Investigation of Cuprizone-induced demyelination in mGFAP-driven conditional transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor knockout mice. *Cells* 9, 81. <https://doi.org/10.3390/cells9010081>.
- Lassmann, H., 2019. Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 9, 3116. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03116>.
- Leary, S.C., Hill, B.C., Lyons, C.N., Carlson, C.G., Michaud, D., Kraft, C.S., Ko, K., Glurum, D.M., Moyes, C.D., 2002. Chronic treatment with Azide *in Situ* leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation. *J. Biol. Chem.* 277, 11321–11328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112303200>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Loeser, J.D., Treede, R.-D., 2008. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain* 137, 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>.
- Ma, M.W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K.M., Vadlamudi, R.K., Brann, D.W., 2017. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol. Neurodegener.* 12, 1–28. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>.
- Madsen, P.M., Motti, D., Karmally, S., Szymkowski, D.E., Lamberts, K.L., Bethea, J.R., Brambilla, R., 2016. Oligodendroglial TNFR2 mediates membrane TNF-dependent repair in experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting oligodendrocyte differentiation and remyelination. *J. Neurosci.* 36, 5128–5143. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0211-16.2016>.
- Mahad, D.H., Trapp, B.D., Lassmann, H., 2015. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 14, 183–193. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70256-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70256-X).
- Makar, T.K., Gerzanich, V., Nimmagadda, V.K.C., Jain, R., Lam, K., Mubariz, F., Trisler, D., Ivanova, S., Woo, S.K., Kwon, M.S., Bryan, J., Bever, C.T., Simard, J.M., 2015. Silencing of Abcc8 or inhibition of newly upregulated Surl1-Trpm4 reduce inflammation and disease progression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroinflammation* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0432-3>.
- Materazzi, S., Fusi, C., Benemei, S., Pedretti, P., Patacchini, R., Nilius, B., Prenen, J., Creminon, C., Geppetti, P., Nassini, R., 2012. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* 463, 561–569. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1071-x>.
- Materazzi, S., Benemei, S., Fusi, C., Gualdani, R., De Siena, G., Vastani, N., Andersson, D.A., Trevisan, G., Moncelli, M.R., Wei, X., Dussor, G., Pollastro, F., Patacchini, R., Appendino, G., Geppetti, P., Nassini, R., 2013. Parthenolide inhibits nociception and neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system by targeting the TRPA1 channel. *Pain* 154, 2750–2758. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.08.002>.
- Mathey, G., Michaud, M., Pittion-Vouyovitch, S., Debouvier, M., 2018. Classification and diagnostic criteria for demyelinating diseases of the central nervous system: where do we stand today? *Rev. Neurol. (Paris)* 174, 378–390. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.01.368>.
- Mcgrath, J.C., Lilley, E., 2015. Implementing Guidelines On Reporting Research Using Animals (ARRIVE etc.): New Requirements For Publication in BJP. <https://doi.org/10.1111/bph>.
- Melzer, N., Hicking, G., Göbel, K., Wiendl, H., 2012. TRPM2 cation channels modulate T cell effector functions and contribute to autoimmune CNS inflammation. *PLoS One* 7, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047617>.
- Mod, R.W., Suh, Y., Weikert, M., 2010. Symptom cluster and quality of life in multiple sclerosis. *J. Pain Symptom Manag.* 39, 1025–1032. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2009.11.312>.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- Musumeci, G., Grasselli, G., Rossi, S., De Chiara, V., Musella, A., Motta, C., Studer, V., Bernardi, G., Haji, N., Sepman, H., Presegna, D., Maccarrone, M., Mandolesi, G., Centonze, D., 2011. Transient receptor potential vanilloid 1 channels modulate the synaptic effects of TNF- α and of IL-1 β in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurobiol. Dis.* 43, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.05.018>.
- Nassini, R., Gees, M., Harrison, S., De Siena, G., Materazzi, S., Moretto, N., Failli, P., Preti, D., Marchetti, N., Cavazzini, A., Mancini, F., Pedretti, P., Nilius, B., Patacchini, R., Geppetti, P., 2011. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain* 152, 1621–1631. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.02.051>.
- Nassini, R., Materazzi, S., Benemei, S., Geppetti, P., 2014. The TRPA1 channel in inflammatory and neuropathic pain and Migraine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1–43. <https://doi.org/10.1007/112.2014.18>.
- Nilius, B., Szallasi, A., 2014. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66, 676–814. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008268>.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., Kohsaka, S., 2004. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. *J. Neurochem.* 88, 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>.
- Olechowski, C.J., Truong, J.J., Kerr, B.J., 2009. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 141, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.11.002>.
- Olechowski, C.J., Parmar, A., Miller, B., Stephan, J., Tenorio, G., Tran, K., Leighton, J., Kerr, B.J., 2010. A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 149, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.03.037>.
- Olechowski, C.J., Tenorio, G., Sauve, Y., Kerr, B.J., 2013. Changes in nociceptive sensitivity and object recognition in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp. Neurol.* 241, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.12.012>.
- Olukman, M., Onal, A., Çelenk, F., Uyanıkgil, Y., Çavuşoğlu, T., Düzenli, N., Ulker, S., 2018. Treatment with NADPH oxidase inhibitor apocynin alleviates diabetic neuropathic pain in rats. *Neural Regen. Res.* 13, 1657. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.232530>.
- Osterberg, A., Boivie, J., 2010. Central pain in multiple sclerosis - sensory abnormalities. *Eur. J. Pain* 14, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.03.003>.
- Othman, A., Frim, D.M., Polak, P., Vujicic, S., Arnason, B.G.W., Anne, I., 2011. Olig1 Is Expressed in Human Oligodendrocytes During Maturation and Regeneration. 926. pp. 914–926. <https://doi.org/10.1002/glia.21163>.
- Paltser, G., Liu, X.J., Yantha, J., Winer, S., Tsui, H., Wu, P., Maezawa, Y., Cahill, L.S., Laliberté, C.L., Ramagopalan, S.V., DeLuca, G.C., Dessa Sadovnick, A., Aststaturov, I., Ebers, G.C., Mark Henkelman, R., Salter, M.W., Dosch, H.M., 2013. TRPV1 gates tissue access and sustains pathogenicity in autoimmune encephalitis. *Mol. Med.* 19, 149–159. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00329>.
- Peiris, M., Monteith, G.R., Roberts-Thomson, S.J., Cabot, P.J., 2007. A model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice for the characterisation of intervention therapies. *J. Neurosci. Methods* 163, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.013>.
- Peschl, P., Bradl, M., Höftberger, R., Berger, T., Reindl, M., 2017. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: deciphering a target in inflammatory demyelinating diseases. *Front. Immunol.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00529>.
- Rahn, E.J., Iannitti, T., Donahue, R.R., Taylor, B.K., 2014. Sex differences in a mouse model of multiple sclerosis: neuropathic pain behavior in females but not males and protection from neurological deficits during proestrus. *Biol. Sex Differ.* 5, 4. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-5-4>.
- Rasmussen, S., Wang, Y., Kivisäkk, P., Bronson, R.T., Meyer, M., Imitola, J., Khoury, S.J., 2007. Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 130, 2816–2829. <https://doi.org/10.1093/brain/awm219>.
- Rigo, F.K., Dalmolin, G.D., Trevisan, G., Tonello, R., Silva, M.A., Rossato, M.F., Klafke, J.Z., do Cordeiro, M.N., Castro Junior, C.J., Montijo, D., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2013. Effect of ω -conotoxin MVIIA and Phal1 β on paclitaxel-induced acute and chronic pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 114–115, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.014>.
- Sághy, É., Sipos, É., Ács, P., Bölskei, K., Pohóczy, K., Kemény, Á., Sándor, Z., Szőke, É., Sétáló, G., Komoly, S., Pintér, E., 2016. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination? A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia* 64, 2166–2180. <https://doi.org/10.1002/glia.23051>.
- Schatzling, B., Steinbach, K., Thies, E., Kruse, M., Menigoz, A., Ufer, F., Flockerzi, V., Brück, W., Pongs, O., Vennekens, R., Kneussel, M., Freichel, M., Merkler, D., Friese,

- M.A., 2012. TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat. Med.* 18, 1805–1811. <https://doi.org/10.1038/nm.3015>.
- So, K., Haraguchi, K., Asakura, K., Isami, K., Sakimoto, S., Shirakawa, H., Mori, Y., Nakagawa, T., Kaneko, S., 2015. Involvement of TRPM2 in a wide range of inflammatory and neuropathic pain mouse models. *J. Pharmacol. Sci.* 127, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jpsh.2014.10.003>.
- Solaro, C., Messmer Uccelli, M., 2011. Management of pain in multiple sclerosis: a pharmacological approach. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 519–527. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2011.120>.
- Solaro, C., Bricchetto, G., Battaglia, M.A., Messmer Uccelli, M., Mancardi, G.L., 2005. Antiepileptic medications in multiple sclerosis: adverse effects in a three-year follow-up study. *Neurol. Sci.* 25, 307–310. <https://doi.org/10.1007/s10072-004-0362-9>.
- Thompson, A.J., Baranzini, S.E., Geurts, J., Hemmer, B., Ciccarelli, O., 2018. Multiple sclerosis. *Lancet* 391, 1622–1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1).
- Tonello, R., Rigo, F., Gewehr, C., Trevisan, G., Pereira, E.M.R., Gomez, M.V., Ferreira, J., 2014. Action of $\text{Phe}1\beta$, a peptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriciventis*, on the analgesic and adverse effects caused by morphine in mice. *J. Pain* 15, 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.02.007>.
- Trevisan, G., Rossato, M.F., Walker, C.L.B., Klafke, J.Z., Rosa, F., Oliveira, S.M., Tonello, R., Guerra, G.P., Boligon, A.A., Zanon, R.B., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2012. Identification of the plant steroid α -spirosterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 258–269. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.195909>.
- Trevisan, G., Hoffmeister, C., Rossato, M.F., Oliveira, S.M., Silva, M.A., Ineu, R.P., Guerra, G.P., Materazzi, S., Fusi, C., Nassini, R., Geppetti, P., Ferreira, J., 2013a. Transient receptor potential Ankyrin 1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during monosodium urate-induced inflammation in rodents. *Arthritis Rheum.* 65, 2984–2995. <https://doi.org/10.1002/art.38112>.
- Trevisan, G., Materazzi, S., Fusi, C., Altomare, A., Aldini, G., Lodovici, M., Patacchini, R., Geppetti, P., Nassini, R., 2013b. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res.* 73, 3120–3131. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4370>.
- Trevisan, G., Rossato, M.F., Walker, C.L.B., Oliveira, S.M., Rosa, F., Tonello, R., Silva, C.R., Machado, P., Boligon, A.A., Martins, M.A.P., Zanatta, N., Bonacorso, H.G., Athayde, M.L., Rubin, M.A., Calixto, J.B., Ferreira, J., 2013c. A novel, potent, oral active and safe antinociceptive pyrazole targeting kappa opioid receptors. *Neuropharmacology* 73, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.011>.
- Trevisan, G., Benemei, S., Materazzi, S., De Logu, F., De Siena, G., Fusi, C., Fortes Rossato, M., Coppi, E., Marone, I.M., Ferreira, J., Geppetti, P., Nassini, R., 2016. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* 139, 1361–1377. <https://doi.org/10.1093/brain/aww038>.
- Truini, A., Galeotti, F., La Cesa, S., Di Rezze, S., Biasiotta, A., Di Stefano, G., Tinelli, E., Millefiorini, E., Gatti, A., Cruccu, G., 2012. Mechanisms of pain in multiple sclerosis: a combined clinical and neurophysiological study. *Pain* 153, 2048–2054. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.05.024>.
- Wang, I.-C., Chung, C.-Y., Liao, F., Chen, C.-C., Lee, C.-H., 2017. Peripheral sensory neuron injury contributes to neuropathic pain in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep42304>.
- Weyer-Menkhoff, L., Lötsch, J., 2018. Human pharmacological approaches to TRP-ion-channel-based analgesic drug development. *Drug Discov. Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.06.020>.
- Woodruff, R.H., Franklin, R.J.M., 1999. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lyssolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: a comparative study. *Glia* 25, 216–228. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990201\)25:3<216::AID-GLIA2>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(19990201)25:3<216::AID-GLIA2>3.0.CO;2-L).
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4).

Research Paper

PAIN®

Transient receptor potential ankyrin 1 mediates headache-related cephalic allodynia in a mouse model of relapsing–remitting multiple sclerosis

Diéssica P. Dalenogare^a, Maria C. Theisen^a, Diulle S. Peres^a, Maria F.P. Fialho^b, Nathaly Andrighetto^a, Laura Barros^a, Lorenzo Landini^c, Mustafa Titiz^c, Francesco De Logu^c, Sara M. Oliveira^b, Pierangelo Geppetti^c, Romina Nassini^c, Gabriela Trevisan^{a,*}

Abstract

Primary headache conditions are frequently associated with multiple sclerosis (MS), but the mechanism that triggers or worsens headaches in patients with MS is poorly understood. We previously showed that the proalgesic transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) mediates hind paw mechanical and cold allodynia in a relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) model in mice. Here, we investigated the development of periorbital mechanical allodynia (PMA) in RR-EAE, a hallmark of headache, and if TRPA1 contributed to this response. RR-EAE induction by injection of the myelin oligodendrocyte peptide fragment_{35–55} (MOG_{35–55}) and Quillaja A adjuvant (Quil A) in C57BL/6J female mice elicited a delayed and sustained PMA. The PMA at day 35 after induction was reduced by the calcitonin gene–related peptide receptor antagonist (olcegepant) and the serotonin 5-HT_{1B/D} receptor agonist (sumatriptan), 2 known antimigraine agents. Genetic deletion or pharmacological blockade of TRPA1 attenuated PMA associated with RR-EAE. The levels of oxidative stress biomarkers (4-hydroxynonenal and hydrogen peroxide, known TRPA1 endogenous agonists) and superoxide dismutase and NADPH oxidase activities were increased in the trigeminal ganglion of RR-EAE mice. Besides, the treatment with antioxidants (apocynin or α -lipoic acid) attenuated PMA. Thus, the results of this study indicate that TRPA1, presumably activated by endogenous agonists, evokes PMA in a mouse model of relapsing–remitting MS.

Keywords: Headache, Sumatriptan, 4-Hydroxynonenal, Hydrogen peroxide, Calcitonin gene–related peptide, NADPH oxidase

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is characterized by a chronic demyelinating and inflammatory process³⁸ that results in several debilitating symptoms, including different types of pain.^{47,71} Several studies have reported that primary headaches, such as migraine tension-type headaches, are more frequent in patients with MS than in the general population.^{33,46,56} Besides, various studies demonstrated a range from 4 to 61.8% of headaches in patients with MS, although the MS mechanisms that result in headaches are poorly known.⁴⁶

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a cationic channel expressed in peripheral pain-detecting sensory neurons.^{7,49,54,68} Transient receptor potential ankyrin 1 has emerged as a specific target for several exogenous headache triggers, and some pieces of evidence demonstrated that various antimigraine medicines have an inhibitory action on TRPA1 channel activity.^{7,37,50,53,54} Besides, TRPA1 is also a recognized sensor of the redox state in the cellular environment⁶⁷ because it is activated by oxidative stress by-products, such as hydrogen peroxide (H₂O₂),⁶⁴ 4-hydroxynonenal (4-HNE),⁶⁹ and nitric oxide.⁵¹

TRPA1 activation in primary sensory neurons also evokes the peripheral release of the calcitonin gene–related peptide (CGRP), and this neuropeptide is the primary mediator of migraine headache.⁴⁴ Calcitonin gene–related peptide subcutaneous injection in the mouse periorbital area or rat trigeminal ganglion (intraganglionic) elicited prolonged periorbital mechanical allodynia (PMA).^{4,44} It was also reported that CGRP released from periorbital trigeminal terminals caused PMA because of the gating of TRPA1 by the promigraine agent, glyceryl trinitrate, in cell bodies of trigeminal neurons.⁴⁹

Facial mechanical allodynia (whisker pad and periorbital region) was detected in a mouse model of progressive MS induced by immunization with the MOG_{35–55} antigen and complete Freund adjuvant (CFA).^{16,18,19} Besides, we recently showed that TRPA1 mediates plantar mechanical and cold allodynia in a mouse model of RR-EAE induced by the immunization with MOG_{35–55} and Quil A.¹⁵ However, until now, no study has evaluated the development of PMA in a RR-EAE model or evaluated the mechanisms involved in this nociceptive behavior.

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

^a Department of Physiology and Pharmacology, Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, Santa Maria, RS, Brazil, ^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate Program in Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil, ^c Department of Health Sciences, Clinical Pharmacology Unit, University of Florence, Florence, Italy

*Corresponding author. Address: Graduated Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Building 21, Room 5207, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208976. E-mail address: gabriela.trevisan-santos@ufsm.br (G. Trevisan).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.painjournalonline.com).

PAIN 00 (2021) 1–10

© 2021 International Association for the Study of Pain

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.00000000000002520>

The aim of this study was 2-fold. First, we explored whether the mouse model of RR-EAE induced by the immunization with MOG_{35–55} and Quil A caused PMA and whether classical antimigraine agents could inhibit this nociceptive response. Second, we investigated whether oxidative stress and TRPA1 were implicated in RR-EAE-induced PMA. Hence, our results indicate that mice developed PMA after RR-EAE induction and antimigraine drugs reduced the periorbital nociception. Furthermore, pharmacological and genetic approaches to reduce TRPA1 activation are able to reduce PMA in this model. Thus, TRPA1 channel seems to be activated by endogenous agonists to cause periorbital nociception after RR-EAE induction.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The following mouse strains were used: C57BL/6J, littermate wild-type (*Trpa1*^{+/+}), and TRPA1-deficient (*Trpa1*^{-/-}) (KWAN et al., 2006) (female, 20–30 g, 4–6 weeks). Women present a high prevalence of developing RRMS²²; thus, the RR-EAE model was optimized in female C57BL/6J.³¹ All the animals (5 per cage) were maintained in controlled temperatures (22 ± 2°C) and bred in-house with a 12-h light–dark cycle (lights on from 7:00 AM to 7:00 PM) and were accommodated with wood shaving bedding and nesting material. Tap water and laboratory standard animal food (Puro Lab 22 PB pellet form, Puro Trato, Rio Grande do Sul, Brazil, and Charles River, Milan, Italy) were provided ad libitum. The animals were moved and acclimatized to the experiment room for at least 1 hour before each procedure. Experiments were performed according to the ethical guidelines to investigate pain in conscious animals (ZIMMERMANN, 1983), and the Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (protocols #8640200617/2017 and #6412121218/2018) and the Italian Ministry of Health (protocol #1194/2015-PR) approved the experimental procedures. Behavioral studies followed the Animal Research Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (MCGRATH; LILLEY, 2015). All experiments were performed by an operator blinded to drug administration and genotype. Besides, more information about the experimental protocols is provided in Figure 1 Supplementary. The protocols described in Supplementary Fig 1 (A and B, available at <http://links.lww.com/PAIN/B525>) were performed only for this study. Besides the protocols described in Supplementary Fig 1(C) (available at <http://links.lww.com/PAIN/B525>), the results for mechanical and cold allodynia in the paw were previously published.¹⁶ The total sample size for each experiment set was calculated by GPower 3.1 software. The GPower 3.1 software defined a sample size of n = 8 animals per group. This calculation agrees with other articles published in the pain research and studies using the EAE model.^{1,15,30,60,61,63}

2.2. Reagents

If not otherwise indicated, all reagents were from Merck Life Science SRL (St. Louis, MO). Mouse myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG_{35–55}) was synthesized by EZBiolab (Carmel, CA).

2.3. Relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model

A mouse model of RR-EAE was performed by the subcutaneous injection of a mixed solution of MOG_{35–55} antigen (200 µg) and

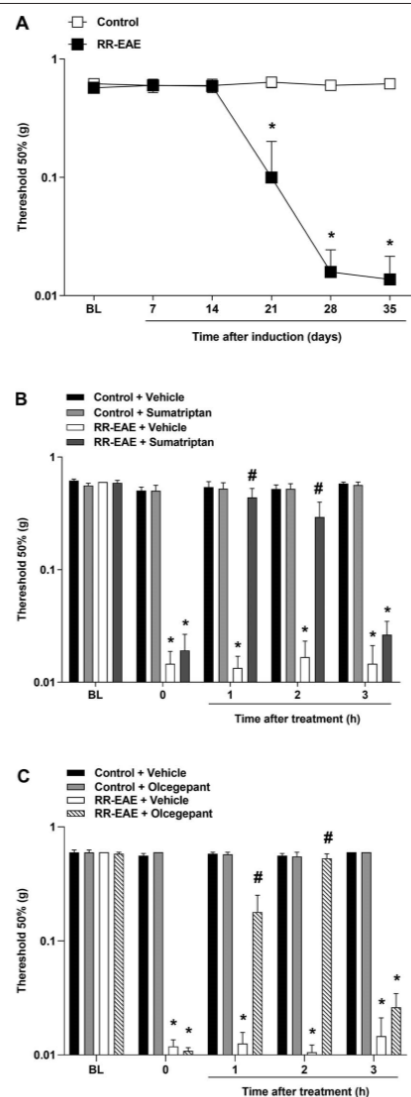


Figure 1. Mice developed periorbital mechanical allodynia (PMA) after relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) induction, and sumatriptan or olcegepant administration showed an anti-allodynic effect. (A) PMA was detected on days 21 to 35 after RR-EAE induction. The vehicle group received isotonic saline 0.9% i.g. (sumatriptan) or dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% in isotonic saline 0.9% i.p. (olcegepant). The treatment with (B) sumatriptan (0.6 mg/kg, intragastric, i.g.) and (C) olcegepant (1 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) or vehicle (4% DMSO plus 4% Tween 80 in isotonic saline 0.9%) was given on day 35 postinduction (p.i., time 0) of the RR-EAE model. Baseline measurements (described as BL in the graph) were observed before induction. Data are expressed as mean ± SEM. (n = 8) for graphs B or C. *P < 0.05 when compared with the control group or baseline (BL) values; and #P < 0.05 when compared with RR-EAE vehicle-treated group [two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test]. ANOVA, analysis of variance.

Quil A (45 μg) in phosphate-buffered saline solution (100 μL).^{15,29,31} The mixture, containing MCG₃₅₋₅₅ and Quil A, was injected in 2 equal amounts (50 μL) into both flanks on day 0. On day 0 and 48 hours (day 2) postinduction (p.i.), mice received pertussis toxin (250 ng) diluted in phosphate-buffered saline (1 ng/ μL) by intraperitoneal (i.p.) injection. Control mice only received equal doses of Quil A and pertussis toxin.^{15,29,31}

2.4. Assessment of relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis clinical signs

The assessment of the RR-EAE clinical signs in immunized mice and the control group was performed once a week over an experimental period of 35 days in a randomized, blinded manner using the clinical disease scoring paradigm. The score was assessed according to the following scale: 0, normal behavior; 0.5, limpness of the distal tail region and hunched appearance; 1, completely limp tail or developing weakness in the hind limbs; 1.5, limp tail and distinct hind limbs weakness recognized by unsteady gait and poor grip of hind limbs while hanging on cage underside; 2, limp tail with unilateral partial hind limb paralysis; 2.5, limp tail and partial paralysis of bilateral hind limbs; 3, complete paralysis of bilateral hind limbs; 3.5, complete bilateral hind limbs paralysis and unilateral forelimb paralysis; and 4, quadriplegia. Clinical scores ≤ 0.5 were indicative of no disease or disease remission,³¹ and if clinical scores were > 1.5 , animals were excluded from the study. Besides, if an animal showed a weight loss of 20 to 30% of the initial weight, the animal was excluded from the experiments. Mice were monitored weekly after RR-EAE post-induction for the assessment of the RR-EAE clinical signs and weight.

2.5. Behavioral studies

2.5.1. Rotarod test

Mice were trained on the rotarod apparatus 1 day before induction. Mice were individually placed on the rotarod apparatus (fixed speed 16 rpm and 180 seconds), and the latency to the first fall was recorded.^{58–60} This session was repeated 2 times. The rotarod test was performed on days 7, 14, 21, 28, and 35 p.i. of RR-EAE. Animals that failed to stay 180 seconds in the rotarod were removed from the study.^{31,59} All mice developed the RR-EAE clinical scores without significant weight loss or reduction of locomotor function or coordination, and no animals were excluded from the study, as reported in previous studies.^{15,31}

2.5.2. Periorbital mechanical allodynia

The periorbital mechanical threshold was evaluated using an up-and-down paradigm.^{12,68} Mice were individually placed in a restrained apparatus designed for the evaluation of the periorbital mechanical threshold. One day before the first behavioral observation, mice were habituated to the apparatus. On the day of the experiment, after 60 minutes of adaptation inside the chamber, a series of von Frey filaments in logarithmic increments of force (0.008, 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, and 0.6 g) were applied to the periorbital area perpendicular to the skin, with sufficient force to cause slight buckling, and held for approximately 5 seconds to elicit a positive response. The response was considered positive by the following criteria: mouse vigorously stroking its face with the forepaw, head withdrawal from the stimulus, or head shaking. The test was initiated with the 0.07 g filament. The absence of response after 5 seconds led to the use of a filament with increased force, whereas a positive response led to the use of a weaker filament. Six measurements were collected for each mouse or until 4

consecutive positive or negative responses occurred. The periorbital mechanical withdrawal threshold (expressed in g) was then calculated from the resulting scores.¹⁷

2.6. Treatment protocols

At day 35, induced and control mice received TRPA1 antagonists, HC-030031, A-967079,^{3,15,63,68} metamizole, or propylphenazone^{52,63}; the antioxidants, α -lipoic acid or apocynin^{15,63,68} (all, 100 mg/kg); sumatriptan^{11,26} (0.6 mg/kg); or their vehicles (dimethyl sulfoxide, DMSO 1%; in isotonic saline 0.9%) by oral gavage (intragastric, i.g., 10 mL/kg). Olcegepant (1 mg/kg)⁴⁹ or its vehicle (4% DMSO plus 4% Tween 80 in isotonic saline 0.9%) was administered by i.p. injection (10 mL/kg). PMA was evaluated from 1 to 3 hours after vehicle or compound administration because no compound showed an antinociceptive effect 3 hours after injection.

2.7. Determination of oxidative biomarkers

On day 35, after RR-EAE induction or control, mice were killed, and the trigeminal ganglion and brainstem were dissected. The samples were homogenized in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at 4°C to determine oxidative stress biomarkers.

2.7.1. Four-hydroxynonenal and H₂O₂ levels determination

According to the manufacturer's protocol, the content of 4-HNE was analyzed using an OxiSelect HNE Adduct Competitive Elisa Kit (Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA).¹⁵ The levels of 4-HNE were expressed in the percentage of 4-HNE when compared with the control group.

The levels of H₂O₂ were determined using the phenol red-horseradish peroxidase (HRPO) method.⁹ In brief, 25 mM of sodium azide was added to supernatants to inhibit the cytochrome c oxidase enzyme present in samples.³⁹ The homogenate-containing sodium azide was centrifuged at 12,000 \times g for 20 minutes at 4°C. A mixture containing supernatant, 25 μL of phenol red (100 mg/mL), and 5 μL of HRPO (50 mg/mL) was incubated in the dark for 10 minutes at 25°C. The reaction was stopped by adding NaOH (1 M, 20 μL). The absorbance of the enzymatic reaction was read at 610 nm using a SpectraMax i3 Platform (Molecular Devices, LLC, San Diego, CA) microplate reader. H₂O₂ levels were expressed as nanomoles (nmol H₂O₂) per mg protein compared with a standard H₂O₂ sample.

2.7.2. Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity evaluation

To analyze the SOD activity, samples were incubated for 2 minutes with adrenaline and glycine buffer at 30°C, and the absorbance was measured at 480 nm.⁵ The reaction was read in a microkinetic reader (Fisher Biotech, Waltham, MA; BT, 2000). The values of SOD activity were reported as U/mL of the sample.^{2,68} The activity of NADPH oxidase was observed in samples using an appropriate assay kit (CY0100, cytochrome c reductase, NADPH Sigma-Aldrich, Milan, Italy). The NADPH oxidase activity was expressed as U/mL/mg of tissue.

2.8. Quantitative real-time polymerase chain reaction

RNA was purified from trigeminal ganglion and brainstem. According to the manufacturer's protocol, the standard TRIZOL extraction method was used together with an RNeasy Mini Kit

(QIAGEN, 74106). RNA concentration and purity were assessed spectrophotometrically by measuring the absorbance at 280 nm. The RNA was then reverse transcribed using a SuperScript IV One-Step RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; 12595025) according to the manufacturer's protocol. For relative quantification of mRNA compared with the housekeeping gene, real-time PCR was conducted using Rotor-Gene Q (Qiagen, Germantown, MD). The sets of mouse primers were as presented in **Table 1**.

2.9. Statistical analysis

Data were expressed as mean + SEM and analyzed statistically by the parametric and nonparametric Student *t* test, 1-way or 2-way analysis of variance according to the experimental protocol, followed by the posttest Bonferroni when needed. The maximal inhibition (I_{max}) was calculated using the following formula: $100 \times (h \text{ posttreatment} - \text{basal postinduction mean}) / (\text{basal preinduction mean} - \text{basal postinduction mean})$. The individual values were inserted as column statistics in Prism GraphPad and calculated the mean of these values. To meet parametric assumptions, data of mechanical threshold scores were log-transformed before analyses. Differences between groups were considered significant when *P* values were less than 0.05 (*P* < 0.05), using the GraphPad Prism 5.0 program.

3. Results

3.1. Periorbital mechanical allodynia evoked by relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis was reduced by sumatriptan and olcegepant administration

Administration of MOG_{35–55} and Quil A elicited an increase in clinical scores that started at day 14 and peaked at day 35 (supplementary Fig. 2A, available at <http://links.lww.com/PAIN/B525>), indicating the onset of RR-EAE. However, no changes in locomotor activity (supplementary Fig. 2B, available at <http://links.lww.com/PAIN/B525>) or body weight (supplementary Fig. 2C, available at <http://links.lww.com/PAIN/B525>) between RR-EAE and the control group were detected during the 35 days of observation.

Relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis mice developed a time-dependent increase in PMA from day 21 to 35 p.i. (**Fig. 1A**). At day 35 after immunization, treatment with the CGRP receptor antagonist, olcegepant (1 mg/kg, i.p.),⁴⁹ or the serotonin 5-HT_{1BD} receptor agonist, sumatriptan (0.6 mg/kg, i.g.),¹¹ which have shown efficacy in the acute treatment of headache migraine attacks,^{6,48,55} produced a reduction (maximum inhibition was 91% and 73% for olcegepant and sumatriptan, respectively) of PMA, without affecting the mechanical threshold of control mice (**Fig. 1B and C**).

3.2. Transient receptor potential ankyrin 1 genetic deletion and pharmacological inhibition decreased periorbital

mechanical allodynia in relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis mice

At day 35 after immunization, 2 chemically unrelated selective TRPA1 antagonists, HC-030031 (100 mg/kg, i.g.) and A-967079 (100 mg/kg, i.g.), diminished PMA (**Fig. 2A and B**). HC-030031 and A-967079 reduced PMA from 1 to 2 hours after i.g. administration, and the maximum inhibition of PMA produced by HC-030031 and A-967079 was 73% and 80%, respectively (**Fig. 2A and 2B**). Similar inhibition was produced by 2 analgesic drugs that have been recently identified as TRPA1 antagonists,⁵² metamizole (100 mg/kg, i.g.) and propylphenazone (100 mg/kg, i.g.) (**Fig. 2B and C**), which induced a maximum inhibition of 89% and 100% of PMA induction, respectively.

3.3. Transient receptor potential ankyrin 1 genetic deletion impairs periorbital mechanical allodynia development in relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis mice

Further and conclusive proof of the role of TRPA1 in the mouse model of RR-EAE was obtained with mice with genetic deletion of the channel. Immunization with MOG_{35–55} and Quil A adjuvant of female *Trpa1*^{+/+} mice produced a PMA similar to that obtained in C57BL/6, which started at day 21 and was maintained until day 35 (**Fig. 3A**). By contrast, *Trpa1*^{-/-} mice did not develop PMA (**Fig. 3A**). The TRPA1-dependent PMA did not parallel an increase in TRPA1 mRNA expression in the peripheral (trigeminal ganglion) or central nervous system tissue (brainstem) (**Fig. 3B**).

3.4. Oxidative stress mediates periorbital mechanical allodynia in relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis-induced mice

The TRPA1 channel is an oxidative stress sensor activated by an extensive series of reactive oxygen, nitrogen, and carbonyl species, including H₂O₂ and 4-HNE.⁵³ The RR-EAE model induction enhanced the 4-HNE and H₂O₂ levels (**Figs. 4A and B**) and the activities of 2 ROS-catalyzing enzymes, NADPH oxidase and SOD (**Fig. 4C and 4D**), in the trigeminal ganglion. Changes of 4-HNE and H₂O₂ levels or NADPH oxidase and SOD activities were confined to the peripheral neurons as the 4 parameters were not different in the brainstem of immunized mice compared with control mice (**Fig. 4E–G**).

3.5. Treatment with α-lipoic acid and apocynin reduced periorbital mechanical allodynia in the relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis-induced mice

Systemic (i.g) administration of 2 different antioxidants, α-lipoic acid and apocynin (all, 100 mg/kg), induced a (from 1 to 2 hours after administration) reduction of PMA in mice with RR-EAE (**Fig. 5A and B**). The 2 antioxidants did not produce any change in the mechanical threshold compared with control mice (**Fig. 5B**). Maximum inhibition of PMA was 82% and 67% for α-lipoic and apocynin, respectively (**Fig. 5B**). Thus, we hypothesized that

Table 1

List of forward and reverse primers used in reverse transcription-qualitative polymerase chain reaction assays and their respective sequences (5'–3').

Gene	Sequence forward (5'–3')	Sequence reverse (5'–3')	Accession number
Trpa1	GCAGGTGGAACCTCATACCAACT	CACITTCGCTAAGTACCAGAGTGG	NM_177,781
Actb	CATTGCTGAC AGGATGCAGAAGG	TGCTGGAAGTGGACAGT GAGG	NM_007,393

TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1.

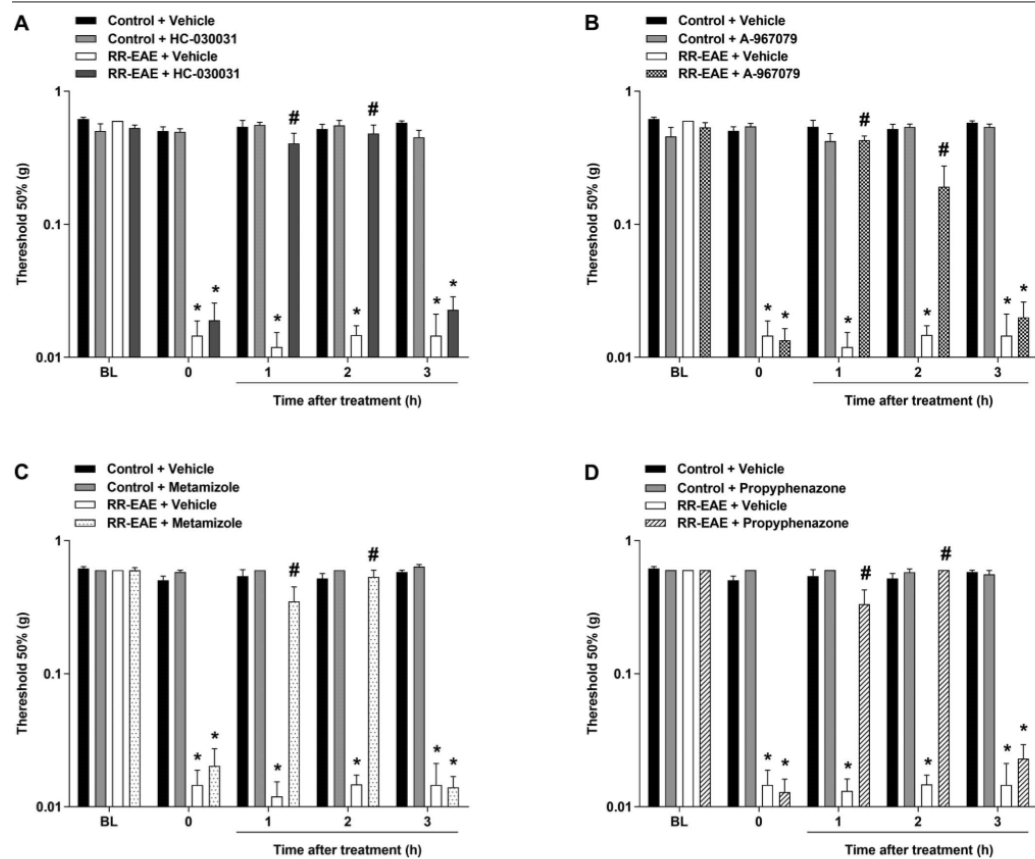


Figure 2. Selective and nonselective TRPA1 antagonists reduced periorbital mechanical allodynia (PMA) caused by a model of relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) induction in mice. Selective TRPA1 antagonists (A) HC-030031 or (B) A-967079 and nonselective TRPA1 antagonists, (C) metamizole or (D) propyphenazone (all 100 mg/kg, intragastric, i.g.), were administered on day 35 postinduction (p.i., time 0) of the RR-EAE model. Baseline measurements (described as BL in the graph) were observed before induction. The vehicle group received dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% in isotonic saline 0.9% by i.g. injection. Data are expressed as mean \pm SEM. (n = 8). * P < 0.05 when compared with the group or baseline values; # P < 0.05 when compared with the RR-EAE vehicle-treated group [two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test]. ANOVA, analysis of variance; TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1.

oxidative stress targeting of TRPA1 in trigeminal ganglion neurons is implicated in PMA evoked by RR-EAE in mice.

4. Discussion

Headache, a common symptom in the initial phases of MS,²⁵ has been associated with demyelinating lesions in the central nervous system.⁴⁷ Despite the high prevalence and deterioration of primary headaches in patients with MS,^{46,47,71} the mechanisms underlying MS-associated headaches are poorly understood. We previously reported that in a model of RR-EAE, mice developed hind paw mechanical and cold allodynia.¹⁵ Here, in the same model, we showed for the first time the development of a delayed and sustained PMA. Allodynia in the periorbital and other cutaneous areas is considered a hallmark of headache in migraine attacks.^{20,27} Recently, using a different model of EAE (progressive EAE), which reproduces a progressive multiple sclerosis model, we detected the role of TRPA1 in periorbital

nociception.¹⁶ Thus, the present finding might be considered the first optimizing model of headache-related cephalic allodynia associated with a RR-EAE model.

Sumatriptan, a mainstay in the acute treatment of migraine attacks,^{6,48} has been found to reduce periorbital nociceptive behaviors in different mouse headache-like models in mice.^{22,26} Currently, to treat headache in humans, only sumatriptan,⁶⁷ metamizole,⁶² and propyphenazone²³ are used by oral route.^{10,48,62} Usually, the antimigraine pharmacotherapy presents a short effect, approximately 4 hours after administration.⁶⁵ In humans, sumatriptan half-time is around 2 hours and has a concentration peak of 45 minutes after oral intake.^{43,65} In addition, in the umbellulone migraine-like model in mice, the sumatriptan showed an antinociceptive effect that lasted 4 hours after i.g. treatment for PMA reduction.³⁵ Olcegepant was discontinued in clinical trials because of problems in oral formulation development⁵⁵ and is used as a CGRP antagonist in headache and migraine-like rodent models by i.p. injection for

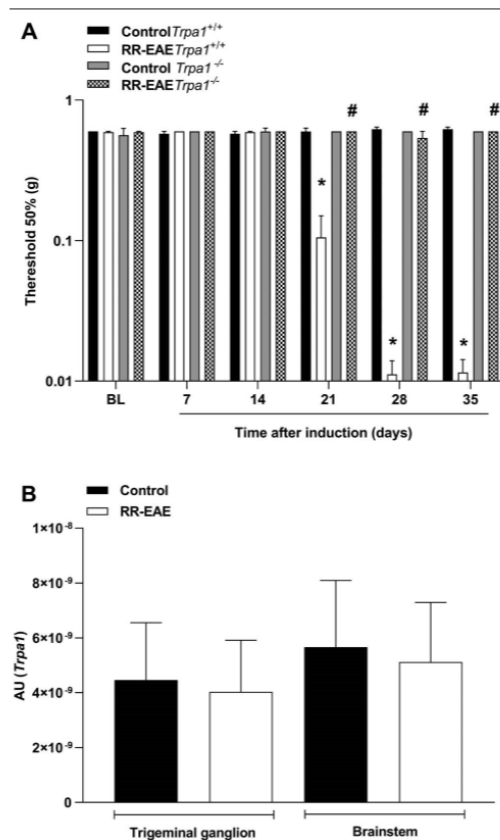


Figure 3. TRPA1 genetic deletion reduced periorbital mechanical allodynia (PMA) in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) in mice. (A) PMA in TRPA1 knockout mice (*Trpa1*^{-/-}) was abolished in RR-EAE-induced mice on day 35 postinduction (p.i.), and *Trpa1*^{+/+} showed nociception after 21 to 35 days of induction. Baseline measurements (described as BL in the graph) were observed before induction. (B) No alteration in *Trpa1* mRNA levels in control and RR-EAE mice was detected in trigeminal ganglion and brainstem samples. Data are expressed as mean + SEM. (von Frey test $n = 6$; qRT-PCR $n = 4-7$). For von Frey test, * $P < 0.05$ when compared with the group or baseline values; # $P < 0.05$ when compared with the RR-EAE wild-type group [two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test (A)]. For qRT-PCR, $P > 0.05$ when compared with the control group [nonparametric Student t test (B and C)]. ANOVA, analysis of variance; TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1.

physiopathology investigations. In humans, the half-time of olcegepant is 2.5 hours after intravenous administration.²⁸ In other studies, using experimental models in rodents, the antinociceptive effect of olcegepant was around 3 to 4 h after i.p. injection.^{35,44}

The validity of the present RR-EAE as a headache-related cephalic allodynia model was further strengthened by the efficacy in reducing PMA of the serotonin 5-HT_{1B/D} receptor agonist, sumatriptan. Here, it was observed that an antinociceptive effect of sumatriptan lasted 2 hours after i.g. administration. Furthermore, olcegepant, a CGRP receptor antagonist reduced PMA in

the present model of RR-EAE during 2 hours after i.p. administration. This CGRP antagonist has shown beneficial effects in relieving the pain of the migraine attack^{12,49} and attenuating allodynia in different migraine models in rodent.^{34,44,49} A large body of evidence reports the implication of TRPA1 in rodent models of trigeminal pain and migraine. The facial allodynia that follows constriction of the infraorbital nerve was attenuated by TRPA1 antagonism or genetic deletion.⁶⁸ PMA evoked by dural application or inhalation of the proheadache volatile compound, umbellulone,^{7,21,54} and systemic exposure to the promigraine drug, glyceryl trinitrate,⁴⁹ were also reduced by genetic and pharmacological inhibition of the TRPA1 channel. However, glyceryl trinitrate may also cause facial nociception by perivascular target activation (endothelium, mast cells, and leukocytes),²⁴ Nrf-2 modulation,¹³ and protease-activated receptor 2 activation³⁶ mechanisms. In addition, umbellulone-induced PMA was prevented by other compounds, including propranolol (a beta-blocker) and nor-binaltorphimine (a kappa opioid receptor antagonist).³⁵

Metamizole and propyphenazone are atypical nonsteroidal anti-inflammatory drugs because their analgesic effect dissociates from their anti-inflammatory action.^{14,45} The notion that metamizole is one of the commonest analgesics used for acute migraine treatment and the recent identification of metamizole and propyphenazone as TRPA1 antagonists⁵² support the channel role in allodynia associated with RR-EAE. Our present data showing attenuated PMA in mice treated with a variety of TRPA1 antagonists (for 2 hours after i.g. injection) or in mice with genetic TRPA1 channel deletion indicate the crucial role of this receptor in PMA evoked by the RR-EAE model.

In clinical research, 4-methylamino-antipyrine, the main metamizole metabolite, showed a half-time of 2.6 to 3.5 hours,⁴² and for propyphenazone, a half-time of approximately 2.8 hours was described,⁷² both after oral administration. Metamizole and propyphenazone were recently discovered as nonselective TRPA1 antagonists that showed an antinociceptive effect until 1 hour after i.g. administration in mice in this study.⁵² The selective TRPA1 antagonists are used only in experimental investigation, and a half-life around 30 minutes for HC-030031 and a distribution half-life of 1.8 hours for A-967079 were observed in rats.⁶⁹ The antinociceptive effect of HC-030031 and A-967079 (same dose used in our study) was 1 to 2 hours when administered in mice in other pain models.^{1,68} Furthermore, in mechanical and cold allodynia tests performed after a neuropathic pain model induced by RR-EAE or PMS-EAE, the TRPA1 antagonists showed an antinociceptive effect during 1 and 2 hours after their administration.^{15,63}

Transient receptor potential ankyrin 1 is generated by an unprecedented series of endogenous agents generated under inflammatory circumstances and oxidative stress.⁵³ NADPH oxidase activity is found in neurons, astrocytes, and microglia,⁸ and SOD, whose activity is associated with TRPA1 stimulation,^{1,3} are critical enzymes in the oxidative stress pathway and ROS generation. The α -lipoic acid pharmacokinetic profile showed a half-life of 2 hours,⁷⁰ and for apocynin, the half-time was approximately 6 hours,⁷³ both by intragastric route in rats. However, the antinociceptive effect of the α -lipoic acid and apocynin was previously detected for 1 and 2 hours in these RR-EAE and PMS-EAE models.^{15,63} Moreover, the antinociceptive action in mice for these antioxidant compounds was detected for 1 and 2 hours after i.g. administration in mice.^{1,3,68} The observation that activities of 2 key enzymes for oxidative stress modulation, SOD and NADPH oxidase, were increased in the trigeminal ganglion and 2 antioxidants, apocynin and α -lipoic

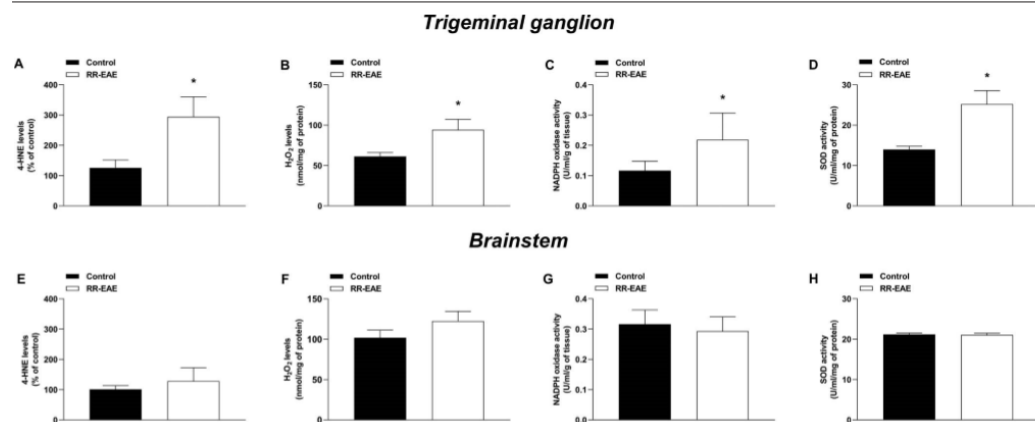


Figure 4. TRPA1 endogenous agonist production, NADPH oxidase, and superoxide dismutase (SOD) activities were increased in the trigeminal ganglion of relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE)-induced mice. Measurement of (A) 4-hydroxynonenal (4-HNE) and (B) hydrogen peroxide (H₂O₂) levels, (C) NADPH oxidase, and (D) SOD activity in trigeminal ganglion samples 35 days after RR-EAE mice induction. Measurement of (E) 4-HNE, (F) H₂O₂ levels, (G) NADPH oxidase, and (H) SOD activity in brainstem samples 35 days after RR-EAE mice induction. Data are expressed as mean + SEM. (n = 5–6). *P < 0.05 when compared with the control group [nonparametric Student *t* test (A, B, E, and F) and parametric Student *t* test (C, D, G, and H)]. TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1.

acid, attenuated PMA associated with RR-EAE suggests that activation of TRPA1 channel by oxidative stress sustains PMA.

TRPA1 is implicated in nociception induction in different models of periorbital pain in mice.^{7,49,54,68} Here, we found an increase of SOD and NADPH activity and 4-HNE and H₂O₂ levels in the trigeminal ganglion of RR-EAE-induced mice compared with the control group, and no alteration in brainstem samples was found for these oxidative markers. Thus, our results showed the hypothesis that TRPA1 activation in trigeminal ganglion by oxidative agonists maintains PMA in this model of RR-EAE, differently from the result obtained previously for the spinal cord and induction of mechanical and cold allodynia in the hind paw.¹⁵ Similarly, in a previous study, glyceryl trinitrate *i.p.* injection failed to increase 4-HNE in the brainstem but increased the levels of this TRPA1 endogenous compounds in the trigeminal ganglion.⁴⁹ Moreover, in a model of EAE in mice, no alteration in microglial activation in the spinal trigeminal nucleus has been found, but an increase in this neuroinflammatory parameter in the dorsal horn spinal cord has been shown, although it has been described as facial and hind paw mechanical allodynia. However, the study described immune cell infiltration in trigeminal ganglion after EAE induction in mice.¹⁹ Thus, the neuroinflammation caused by EAE could be different in the brainstem and spinal cord areas. The TRPA1 is expressed in the brainstem, specifically in the astrocytes and neurons of the superficial laminae of the trigeminal caudal nucleus (Vc) in rats.^{32,40} and also in the trigeminal ganglion in mice and rats.^{32,49} Besides, trigeminal ganglion neuron cell bodies that mediate PMA in this RR-EAE model could be included in meningeal nociceptors. This class of sensory neurons contributes to the periorbital sensitization to different inflammatory mediators and TRPA1 agonists.^{21,41,49,66,74} However, more investigation is necessary to elucidate other specific brainstem areas which could be involved in the TRPA1 mediates headache-related cephalic allodynia in this RR-EAE model.

It was also reported that CGRP released from periorbital trigeminal terminals caused PMA because of the gating of TRPA1 by the promigraine agent, glyceryl trinitrate, in trigeminal neuron cell bodies.⁴⁹ Nevertheless, the TRPA1

channel contribution in endogenous pathways implicated in rodent models of headache-related cephalic allodynia is unknown. Here, for the first time, we show that TRPA1, presumably activated by oxidative stress associated with RR-EAE, is crucial for sustaining PMA. These results are in accordance with our previous study showing that TRPA1 is also involved in periorbital allodynia caused by a PMS-EAE model in mice.¹⁶ Whether this mechanism is implicated in the *de novo* onset or worsening of a preexisting primary headache in patients with MS will be the object of future studies.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

Fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are also acknowledged. Diéssica Padilha Dalenogare fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [process # 88882.428089/2019-01] and Programa Institucional de Internacionalização CAPES [process #88887.374020/2019-00]. G. Trevisan is recipient of a fellowship from CNPq [process #303531/2020-7], L'ORÉAL - ABC - UNESCO Para Mulheres na Ciência, 2016 and Prêmio Capes de Teses - Ciências Biológicas II, CAPES, 2014 [process #23038.006930/2014/59]. This work was also supported by European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement No. 835286) (Pierangelo Geppetti). The funding source was not involved in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. Author contributions: All the authors discussed the results, commented on the manuscript, and approved this final version. (1) Substantial contributions to conception and design, data

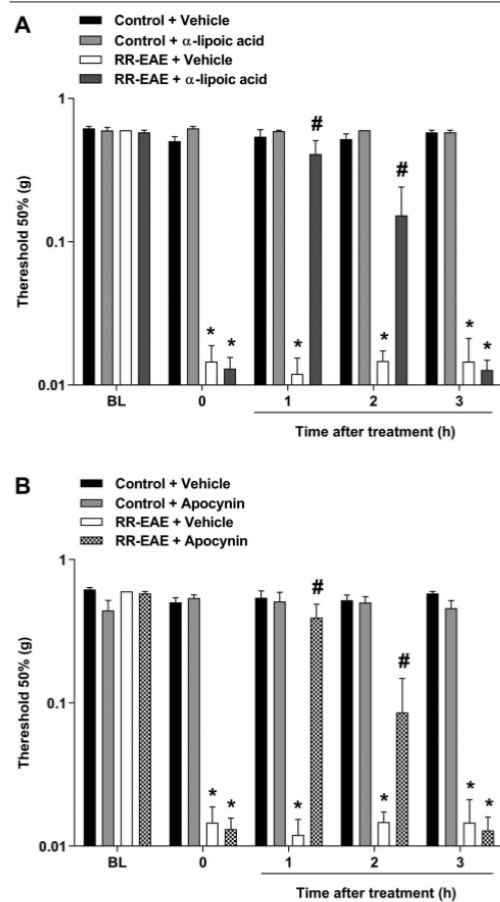


Figure 5. Treatment with α -lipoic acid and apocynin reduced periorbital mechanical allodynia (PMA) in the relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE)-induced mice. The treatment with (A) α -lipoic acid (100 mg/kg, intragastric, i.g.) and (B) apocynin (100 mg/kg, i.g.) was given on day 35 postinduction (p.i., time 0) of the RR-EAE model, and baseline measurements (described as BL in the graph) were observed before induction. The vehicle group received dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% in isotonic saline 0.9%. Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 8$). * $P < 0.05$ when compared with the group or baseline values; # $P < 0.05$ when compared with the group treated with a vehicle [two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test]. ANOVA, analysis of variance.

acquisition, analysis, and interpretation: D.P. Dalenogare, M.C. Theisen, D.S. Peres, M.F.P. Fialho, N. Andriquetto, L. Barros, L. Landini, M. Titz, F. de Logu, S.M. Oliveira, R. Nassini, P. Geppetti, and G. Trevisan. (2) Drafting and critically revising the article for important intellectual content: D.P. Dalenogare, M.C. Theisen, D.S. Peres, M.F.P. Fialho, N. Andriquetto, L. Barros, L. Landini, M. Titz, F. de Logu, S.M. Oliveira, R. Nassini, P. Geppetti, and G. Trevisan. (3) Final article approval: D.P. Dalenogare, M.C. Theisen, D.S. Peres, M.F.P. Fialho, N. Andriquetto, L. Barros, L. Landini, M. Titz, F. de Logu, S.M. Oliveira, R. Nassini, P. Geppetti, and G. Trevisan. (4) Acquisition of funding and general supervision

of the research group: S.M. Oliveira, R. Nassini, P. Geppetti, and G. Trevisan.

Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/B525>.

Article history:

Received 20 May 2021

Received in revised form 1 October 2021

Accepted 7 October 2021

Available online 26 October 2021

References

- [1] de Almeida AS, Rigo FK, De Prá SDT, Miloli AM, Pereira GC, Lückemeyer DD, Antoniazzi CTDD, Kudsi SQ, de Araújo DSM, de Oliveira SM, Ferreira J, Trevisan G. Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma. *Pharmacol Res* 2020;152:104576.
- [2] Antoniazzi CTDeD, De Prá SDT, Ferro PR, Silva MA, Adamante G, de Almeida AS, Camponogara C, da Silva CR, de Bem Silveira G, Silveira PCL, Oliveira SM, Rigo FK, De Logu F, Nassini R, Trevisan G. Topical treatment with a transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonist reduced nociception and inflammation in a thermal lesion model in rats. *Eur J Pharm Sci* 2018;125:28–38.
- [3] Antoniazzi CTDD, Nassini R, Rigo FK, Miloli AM, Bellinaso F, Camponogara C, Silva CR, de Almeida AS, Rossato MF, De Logu F, Oliveira SM, Cunha TM, Geppetti P, Ferreira J, Trevisan G. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. *Int J Cancer* 2019;144:355–65.
- [4] Araya I, JM T, AR B, JG C. Contribution of intraganglionic CGRP to migraine-like responses in male and female rats. *Cephalalgia* 2020;40:689–700.
- [5] Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;32:279–312.
- [6] Becker WJ. Acute migraine treatment in adults. *Headache* 2015;55:778–93.
- [7] Benemei S, De Logu F, Li Puma S, Marone IM, Coppi E, Ugolini F, Liedtke W, Polliastro F, Appendino G, Geppetti P, Materazzi S, Nassini R. The anti-migraine component of butterbur extracts, isopetasin, desensitizes peptidergic nociceptors by acting on TRPA1 cation channel. *Br J Pharmacol* 2017;174:2897–911.
- [8] Borkum JM. Migraine triggers and oxidative stress: a narrative review and synthesis. *Headache J Head Face Pain* 2016;56:12–35.
- [9] Brum Eda S, Becker G, Fialho MFP, Casoti R, Trevisan G, Oliveira SM. TRPA1 involvement in analgesia induced by *Tabernaemontana catharinensis* ethyl acetate fraction in mice. *Phytomedicine* 2019;54:248–58.
- [10] Burdan F. Developmental effects of propyphenazone in analgesic and antipyretic combination with caffeine or paracetamol. *Hum Exp Toxicol* 2004;23:235–44.
- [11] Burgos-Vega CC, Ahn DD-U, Bischoff C, Wang W, Home D, Wang J, Gawa N, Dussor G. Meningeal transient receptor potential channel M8 activation causes cutaneous facial and hindpaw allodynia in a preclinical rodent model of headache. *Cephalalgia* 2016;36:185–93.
- [12] Burgos-Vega CC, Quigley LD, Trevisan G, Yan F, Asiedu M, Jacobs B, Motina M, Safdar N, Yousuf H, Avona A, Price TJ, Dussor G. Non-invasive dural stimulation in mice: a novel preclinical model of migraine. *Cephalalgia* 2019;39:123–34.
- [13] Casili G, Lanza M, Filippone A, Campolo M, Paterniti I, Cuzzocrea S, Esposito E. Dimethyl fumarate alleviates the nitroglycerin (NTG)-induced migraine in mice. *J Neuroinflammation* 2020;17. doi:10.1186/s12974-020-01736-1.
- [14] Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13926–31.
- [15] Dalenogare DP, Theisen MC, Peres DS, Fialho MFP, Lückemeyer DD, Antoniazzi CTDeD, Kudsi SQ, Ferreira MdeA, Ritterdos CS, Ferreira J, Oliveira SM, Trevisan G. TRPA1 activation mediates nociception

- behaviors in a mouse model of relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol* 2020;328:113241.
- [16] Dalenogare DPPP, Ritter C, Bellinaso FRAF, Kudsí SSQ, Pereira GGC, Fialho MFP, Lückemeyer DDD, Antoniazzi CCT de D, Landini L, Ferreira J, Bochi GVG, Oliveira SMS, De Logu F, Nassini R, Geppetti P, Trevisan G. Periorbital nociception in a progressive multiple sclerosis mouse model is dependent on TRPA1 channel activation. *Pharmaceuticals* 2021;14:831.
- [17] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980;20:441–62.
- [18] Duffy SS, Keating BA, Perera CJ, Lees JG, Tonkin RS, Makker PGS, Carrive P, Butovsky O, Moalem-Taylor G. Regulatory T cells and their derived cytokine, interleukin-35, reduce pain in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 2019;39:2326–46.
- [19] Duffy SS, Perera CJ, Makker PGS, Lees JG, Carrive P, Moalem-Taylor G. Peripheral and central neuroinflammatory changes and pain behaviors in an animal model of multiple sclerosis. *Front Immunol* 2016;7:22.
- [20] Eberhardt M, Dux M, Namer B, Miljkovic J, Cordasic N, Will C, Kichko TI, De La Roche J, Fischer M, Suárez SA, Bikiel D, Dorsch K, Leffler A, Babes A, Lampert A, Lennerz JK, Jacobi J, Marti MA, Doctorovich F, Högestätt ED, Zygmunt PM, Ivanovic-Burmazovic I, Messlinger K, Reeh P, Filipovic MR. H2S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun* 2014;5:4381.
- [21] Edelmayer RM, Le LN, Yan J, Wei X, Nassini R, Materazzi S, Preti D, Appendino G, Geppetti P, Dodick DW, Vanderah TW, Porreca F, Dussor G. Activation of TRPA1 on dural afferents: a potential mechanism of headache pain. *PAIN* 2012;153:1949–58.
- [22] Edelmayer RM, Vanderah TW, Majuta L, En-Tan Z, Fioravanti B, De Felice M, Chichorro JG, Ossipov MH, King T, Lai J, Kori SH, Nelsen AC, Cannon KE, Heinricher MM, Porreca F. Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in Headache-Related pain. *Ann Neurol* 2009;65:184–93.
- [23] Ferrari A, Tiraferri I, Palazzoli F, Verri P, Vandelli D, Marchesi F, Ciccarese M, Licata M. Hair analysis to monitor abuse of analgesic combinations containing butalbital and propyphenazone. *J Pharm Biomed Anal* 2015;115:576–9.
- [24] Ferrari LF, Levine JD, Green PG. Mechanisms mediating nitroglycerin-induced delayed-onset hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 2016;317:121–9.
- [25] Foley PL, Vesterinen HM, Laird BJ, Sena ES, Colvin LA, Chandran S, MacLeod MR, Fallon MT. Prevalence and natural history of pain in adults with multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis. *PAIN* 2013;154:632–42.
- [26] Hassler SN, Ahmad FB, Burgos-Vega CC, Boitano S, Vagner J, Price TJ, Dussor G. Protease activated receptor 2 (PAR2) activation causes migraine-like pain behaviors in mice. *Cephalalgia* 2019;39:111–22.
- [27] Husain F, Pardo G, Rabadi M. Headache and its management in patients with multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 2018;20:10.
- [28] Iovino M, Feifel U, Yong C, Wolters J, Wallenstein G. Safety, tolerability and pharmacokinetics of BIBN 4096 BS, the first selective small molecule calcitonin gene-related peptide receptor antagonist, following single intravenous administration in healthy volunteers. *Cephalalgia* 2004;24:645–56.
- [29] Khan N, Gordon R, Woodruff TM, Smith MT. Antiallodynic effects of alpha lipoic acid in an optimized RR-EAE mouse model of MS-neuropathic pain are accompanied by attenuation of upregulated BDNF-TrkB-ERK signaling in the dorsal horn of the spinal cord. *Pharmacol Res Perspect* 2015;3:e00137.
- [30] Khan N, Smith MT. Multiple sclerosis-induced neuropathic pain: pharmacological management and pathophysiological insights from rodent EAE models. *Inflammopharmacology* 2014;22:1–22.
- [31] Khan N, Woodruff TM, Smith MT. Establishment and characterization of an optimized mouse model of multiple sclerosis-induced neuropathic pain using behavioral, pharmacologic, histologic and immunohistochemical methods. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;126:13–27.
- [32] Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK, Bae YC. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA 1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* 2010;518:687–98.
- [33] Kister I, Caminero AB, Herbert J, Lipton RB. Tension-type headache and migraine in multiple sclerosis. *Curr Pain Headache Rep* 2010;14:441–8.
- [34] Koldbro A, Kumar D, Olesen J, Jörn L, Jansen-olesen I. Pharmacological Reports Effect of TRPA1 activator allyl isothiocyanate (AITC) on rat dural and pial arteries. *Pharmacol Rep* 2019;71:565–72.
- [35] Kopruszinski C, Navratilova, Swiokla J, Dodick DW, Chessell IP, Porreca F. A novel, injury-free rodent model of vulnerability for assessment of acute and preventive therapies reveals temporal contributions of CGRP-receptor activation in migraine-like pain. *Cephalalgia* 2021;41:305–17.
- [36] Kopruszinski C, Thornton J, Arnold J, Newton P, Lowne D, Navratilova E, Swiokla J, Dodick D, Dobson C, Gurrell I, Chessell I, Porreca F. Characterization and preclinical evaluation of a protease activated receptor 2 (PAR2) monoclonal antibody as a preventive therapy for migraine. *Cephalalgia* 2020;40:1535–50.
- [37] Kunkler PE, Ballard CJ, Oxford GS, Hurley JH. TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *PAIN* 2011;152:38–44.
- [38] Lassmann H. Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. *Front Immunol* 2019;9:3116.
- [39] Leary SC, Hill BC, Lyons CN, Carlson CG, Michaud D, Kraft CS, Ko K, Moira Glerum D, Moyes CD. Chronic treatment with azide in situ leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation. *J Biol Chem* 2002;277:11321–8.
- [40] Lee SM, Cho YS, Kim TH, Jin MU, Ahn DK, Noguchi K, Bae YC. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *J Chem Neuroanat* 2012;45:45–9.
- [41] Levy D, Jakubowski M, Burstein R. Disruption of communication between peripheral and central trigeminovascular neurons mediates the antimigraine action of 5HT_{1B/1D} receptor agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4274–9.
- [42] Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B. Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 1995;28:216–34.
- [43] Lionetto L, Negro A, Casolla B, Simmaco M, Martelletti P. Sumatriptan succinate: pharmacokinetics of different formulations in clinical practice. *Expert Opin Pharmacother* 2012;13:2369–80.
- [44] De Logu F, Landini L, Janal MN, Puma SL, Cesaris FDe. Migraine-provoking substances evoke periorbital allodynia in mice. *J Headache Pain* 2019;1:1–9.
- [45] Malvar DDC, Soares DM, Fabricio ASC, Kanashiro A, MacHado RR, Figueiredo MJ, Rae GA, De Souza GEP. The antipyretic effect of dipyrone is unrelated to inhibition of PGE₂ synthesis in the hypothalamus. *Br J Pharmacol* 2011;162:1401–9.
- [46] La Mantia L, Mantia L. Headache and multiple sclerosis: clinical and therapeutic correlations. *Neurol Sci* 2009;30:23–6.
- [47] La Mantia L, Prone V. Headache in multiple sclerosis and autoimmune disorders. *Neurol Sci* 2015;36(Suppl 1):75–8.
- [48] Marmura MJ, Silberstein SD, Schwedt TJ. The acute treatment of migraine in adults: the american headache society evidence assessment of migraine pharmacotherapies. *Headache* 2015;55:3–20.
- [49] Marone IM, De Logu F, Nassini R, De Carvalho Goncalves M, Benemei S, Ferreira J, Jain P, Puma SL, Bunnett NW, Geppetti P, Materazzi S. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice. *Brain* 2018;141:2312–28.
- [50] Materazzi S, Benemei S, Fusi C, Gualdani R, De Siena G, Vastani N, Andersson DA, Trevisan G, Moncelli MR, Wei X, Dussor G, Pollastro F, Patacchini R, Appendino G, Geppetti P, Nassini R. Parthenolide inhibits nociception and neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system by targeting the TRPA1 channel. *PAIN* 2013;154:2750–8.
- [51] Miyamoto T, Dublin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* 2009;4:e7596.
- [52] Nassini R, Fusi C, Materazzi S, Coppi E, Tuccinardi T, Marone IM, Logu FDe, Preti D, Tonello R, Chiarugi A, Patacchini R, Geppetti P, Benemei S. The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives. *Br J Pharmacol* 2015;172:3397.
- [53] Nassini R, Materazzi S, Benemei S, Geppetti P. The TRPA1 channel in inflammatory and neuropathic pain and migraine. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Vol. 167. Germany, Berlin, New York: Springer-Verlag, 2014; 1–43. doi:10.1007/112_2014_18.
- [54] Nassini R, Materazzi S, Vriens J, Prenen J, Benemei S, De Siena G, la Marca G, André E, Preti D, Avonto C, Sadofsky L, Di Marzo V, De Petrocellis L, Dussor G, Porreca F, Tagliabue Scafati O, Appendino G, Nilius B, Geppetti P. The "headache tree" via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain* 2012;135:376–90.
- [55] Negro A, Martelletti P. Gepants for the treatment of migraine. *Expert Opin Investig Drugs* 2019;28:555–67.
- [56] Nicoletti A, Patti F, Lo Fermo S, Liberto A, Castiglione A, Laia P, Garifoli A, La Naia F, Maimone D, Sorbello V, Contrafatto D, Zappia M. Headache and multiple sclerosis: a population-based case-control study in Catania, Sicily. *Cephalalgia* 2008;28:1163–9.
- [57] Ogawa N, Kurokawa T, Mori Y. Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium* 2016;60:115–22.

- [58] Olechowski CJ, Parmar A, Miller B, Stephan J, Tenorio G, Tran K, Leighton J, Kerr BJ. A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *PAIN* 2010;149:565–72.
- [59] Olechowski CJ, Tenorio G, Sauve Y, Kerr BJ. Changes in nociceptive sensitivity and object recognition in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp Neurol* 2013;241:113–21.
- [60] Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *PAIN* 2009;141:156–64.
- [61] De Prá SDT, Antoniazzi CT, Ferro PR, Kudsi SQ, Camponogara C, Fialho MFP, Rigo FK, Gomez MV, Bochi GV, Moresco RN, de Oliveira SM, Trevisan G. Nociceptive mechanisms involved in the acute and chronic phases of a complex regional pain syndrome type 1 model in mice. *Eur J Pharmacol* 2019;859. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2019.172555.
- [62] Ramacciotti AS, Soares BGO, Atallah AN, Hobson A, Atallah AN. Dipyron for acute primary headaches. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17443558/>. Accessed August 11, 2020.
- [63] Ritter C, Dalenogare DP, de Almeida AS, Pereira VL, Pereira GC, Fialho MFP, Lückemeyer DD, Antoniazzi CT, Kudsi SQ, Ferreira J, Oliveira SM, Trevisan G. Nociception in a progressive multiple sclerosis model in mice is dependent on spinal TRPA1 channel activation. *Mol Neurobiol* 2020;57:2420–35.
- [64] Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S, Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci* 2008;27:1131–42.
- [65] Scott A. Sumatriptan clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1994;27:337–44.
- [66] Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* 1996;384:560–4.
- [67] Thorlund K, Toor K, Wu P, Chan K, Druyts E, Ramos E, Bhambrri R, Donnet A, Stark R, Goadsby PJ. Comparative tolerability of treatments for acute migraine: a network meta-analysis. *Cephalalgia* 2017;37:965–78.
- [68] Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, Logu FDe, Siena GDe, Fusi C, Fossato MF, Coppi E, Marone M, Ferreira J, Geppetti P, Nassini R. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* 2016;139:1361–77.
- [69] Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnnett NW, Julius D, Geppetti P, André E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnnett NW, Julius D, Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:13519–24.
- [70] Uchida R, Okamoto H, Ikuta N, Terao K, Hirota T. Enantioselective pharmacokinetics of α -lipoic acid in rats. *Int J Mol Sci* 2015;16:22781–94.
- [71] Urits I, Adamian L, Fiocchi J, Hoyt D, Ernst C, Kaye AD, Viswanath O. Advances in the understanding and management of chronic pain in multiple sclerosis: a comprehensive review. *Curr Pain Headache Rep* 2019;23:1–11.
- [72] Volz M, Kellner H. Kinetics and metabolism of pyrazolones (propyphenazone, aminopyrine and dipyron). *Br J Clin Pharmacol* 1980;10:299S–308S.
- [73] Wang K, Li L, Song Y, Ye X, Fu S. Improvement of pharmacokinetics behavior of apocynin by nitron derivatization: comparative pharmacokinetics of nitron-apocynin and its parent apocynin in rats) improvement of pharmacokinetics behavior of apocynin by nitron derivatization: comparative pharmacokinetics of nitron-apocynin and its parent apocynin in rats. *PLoS One* 2013;8:211.
- [74] Zhang X, Kainz V, Zhao J, Strassman AM, Levy D. Vascular extracellular signal-regulated kinase mediates migraine-related sensitization of meningeal nociceptors. *Ann Neurol* 2013;73:741–50.

Supplementary Material: Figures and Tables

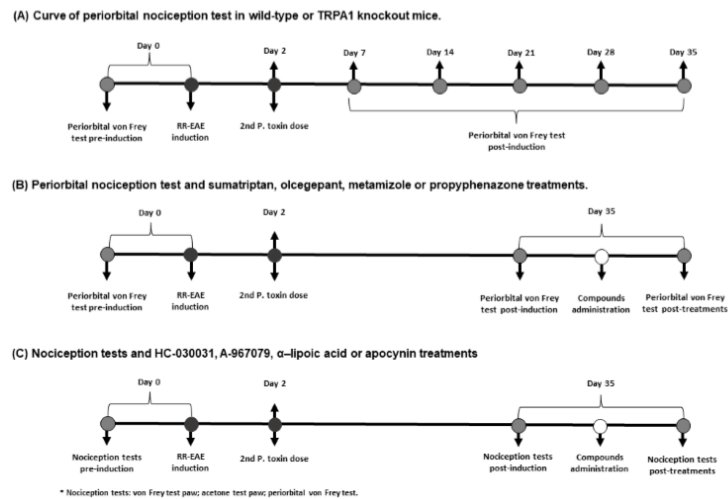


Fig 1 Supplementary. Experimental timelines. (A) Timeline curve of periorbital mechanical allodynia in wild-type (n=8) and TRPA1 knockout mice (n=6). (B) Timeline of periorbital mechanical allodynia test and sumatriptan, olcegepant, metamizole or propyphenazone treatments (n=8). (C) Nociception tests (von Frey and acetone in paw area, or von Frey test in periorbital area) and HC-030031, A-967079, α -lipoic acid or apocynin treatments (n=8).

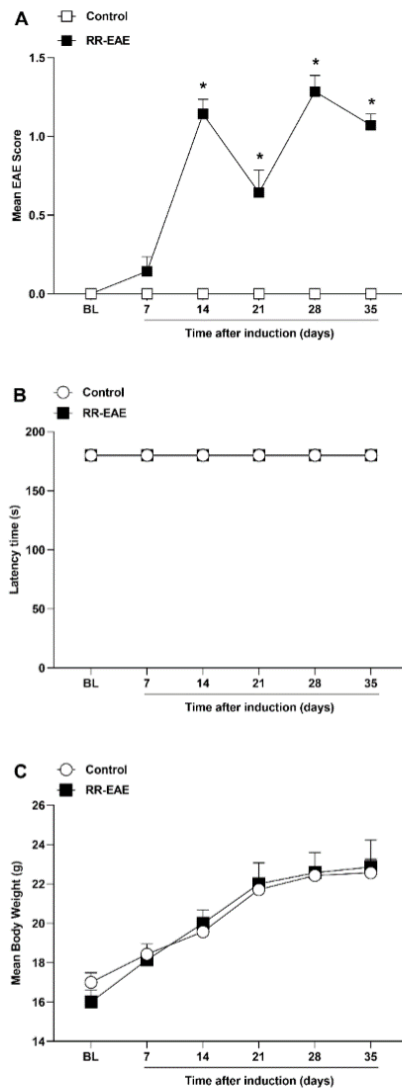


Fig. 2 Supplementary. The relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) caused clinical score changes without inducing locomotor or bodyweight alteration. (A) Measurement of clinical score, (B) latency time for fall measured by rotarod test, and (C) weight of animals for 7 to 35 days post-induction (p.i.) of RR-EAE induced mice. Data are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 8$). * $P < 0.05$, when compared to the control group or baseline values [Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test (in A, B and C)].

4.3 MANUSCRITO 1

TRPA1 involvement in neuropathic-like nociception and spinal cord neuroinflammation in models of multiple sclerosis in mice

Diéssica Padilha Dalenogare^{a§}, Daniel Souza Monteiro de Araújo^{b§}, Lorenzo Landini^b, Mustafa Titiz^b, Gaetano De Siena^b, Francesco De Logu^b, Pierangelo Geppetti^b, Romina Nassini^b, Gabriela Trevisan^{a,*}

^a Graduated Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

^b Department of Health Sciences, Clinical Pharmacology Unit, University of Florence, 50139 Florence, Italy.

*Corresponding author:

Gabriela Trevisan, Graduated Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, building 21, room 5207, Zip code: 97105-900 Santa Maria (RS), Brazil, Phone: +55 55 32208976, Email: gabrielatrevisansantos@gmail.com or gabriela.trevisan-santos@ufsm.br.

§Equally contributed

ABSTRACT

Neuroinflammation is considered the underlying mechanism of neuropathic pain associated with multiple sclerosis (MS). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation has been implicated in neuropathic pain-like symptoms in two different experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice model. However, it is unknown whether TRPA1 is solely implicated in EAE pain-signaling or contributes to neuroinflammation. Here, we evaluated the role of TRPA1 in neuroinflammation underlying pain-like symptoms in two different models of EAE. Using the antigen myelin oligodendrocyte glycoprotein₃₅₋₅₅ (MOG₃₅₋₅₅), C57BL/6J, *Trpa1*^{+/+} or *Trpa1*^{-/-} female mice developed relapsing-remitting (RRMS) (MOG₃₅₋₅₅ plus Quil A adjuvant) or progressive multiple sclerosis (PMS) (MOG₃₅₋₅₅ plus complete Freund's adjuvant) EAE. Mechanical and cold allodynia detected in RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1*^{+/+} mice were not observed in *Trpa1*^{-/-} mice. The increased number of cells labeled for ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) or glial fibrillary acidic protein (GFAP), two neuroinflammatory markers in the spinal cord observed in both RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1*^{+/+} mice was reduced in *Trpa1*^{-/-} mice. By Olig2 marker and luxol fast blue staining it was observed prevention of demyelinating process in TRPA1 knockout induced mice. However, TRPA1 deletion did not reduce the clinical scores in both models, present results indicate that the proalgesic role of TRPA1 in both EAE mouse models is primarily mediated by its ability to promote spinal neuroinflammation, and further strengthen the channel inhibition to treat the pain symptoms of MS.

Keywords: ionized calcium-binding adapter molecule 1; multiple sclerosis; glial fibrillary acidic protein; ion channel; pain.

1 INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS), an autoimmune disease associated with extensive inflammatory and demyelinating processes in the brain and spinal cord ¹, is classified into three subtypes: relapsing-remitting MS (RRMS), primary progressive MS (PPMS), and secondary progressive MS (SPMS) ². RRMS (85% of the diagnosis) is characterized by neurological dysfunction and partial recovery periods ³. Progressive MS subtypes are characterized by intense neurodegenerative processes, resulting in a progressive worsening of physiological functions. Mouse models that recapitulate RRMS and PMS encompass experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) evoked by Quil A adjuvant (RR-EAE) or complete Freund's adjuvant (PMS-EAE) in animals treated with antigen myelin oligodendrocyte glycoprotein₃₅₋₅₅ (MOG₃₅₋₅₅). Although pain is one of the major disabling symptoms of MS its underlying mechanism remains poorly understood. In particular, the implication of inflammatory process in MS pain symptoms continues not completely investigated.

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a cation channel activated by irritant compounds, including the prototypic, allyl isothiocyanate (AITC) and by a large series of reactive endogenous agonists, as hydrogen peroxide (H₂O₂) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) ⁴⁻⁶. The original identification of TRPA1 in a heterogeneous subpopulation primary sensory neurons, mostly colocalized with TRP vanilloid 1 (TRPV1) has driven research on the channel role to signal pain from the peripheral nervous system to the brain ⁷.

TRPA1 is expressed in central and peripheral glial cells ^{8,9}, such as astrocytes ¹⁰ oligodendrocytes ¹¹ and Schwann cells ¹², being associated to ischemia related neural damage ¹¹ or chronic allodynia ¹³. The activation of inflammatory cells of the central nervous system (CNS) has been documented in RR-EAE mice ¹⁴. Enhancement of cells expressing glial fibrillary acidic protein (GFAP⁺), a specific marker of activated astrocytes, and increased Iba1⁺ cells, a marker of macrophages/microglia has been detected in the corpus callosum, hippocampus, and lumbar spinal cord section from RR-EAE mice ¹⁴. A possible role of TRPA1 has been reported in models of MS, as in a mouse model of demyelinating disease induced by cuprizone, TRPA1 activation expressed by astrocytes

elicits the release of pro-inflammatory mediators which contributes to oligodendrocyte apoptosis¹⁵. We, recently, observed that the increase in mechanical and cold allodynia in mouse RR-EAE and PMS-EAE models was attenuated by treatment with TRPA1 antagonists^{16,17}, suggesting that the channel mediates hypersensitivity in both mice model of EAE. However, the implication of the blockade of the central or peripheral TRPA1 and of the channel ability to promote neuroinflammation in EAE-evoked mechanical and cold allodynia is unknown.

Here, by using C57BL/6J wild type or deleted (*Trpa1*^{+/+} or *Trpa1*^{-/-}, respectively) female mice we report that TRPA1 is essential for the development of mechanical and cold allodynia in both RR-EAE and PMS-EAE. In addition, we show that TRPA1 deletion attenuated the increase expression of Iba1⁺ and GFAP⁺ in spinal cord, or the Olig2 marker and luxol fast blue staining.

2 METHODS

2.1 Animals

The following mouse strains were used: C57BL/6J, littermate wild-type (*Trpa1*^{+/+}), and TRPA1-deficient (*Trpa1*^{-/-})¹⁸ (female, 20-30 g, 4-6 weeks). All the animals (5 per cage) were accommodated with wood shaving bedding and nesting material and were maintained in controlled temperatures (22 ± 2°C) and bred in-house with a 12-h light/dark cycle (lights on 7:00 am to 7:00 pm). Water and laboratory standard animal food (Charles River, Milan, Italy) were provided *ad libitum*. According to the ethical guidelines, experiments were performed to investigate pain in conscious animals¹⁹, and the Italian Ministry of Health (protocol #1194/2015-PR) approved the experimental procedures. Behavioral studies followed the Animal Research Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines²⁰. Animals were moved and acclimatized to the experiment room for at least one hour before each procedure. All experiments were performed by an operator blinded to drug administration and genotype.

2.2 Multiple sclerosis models induction

To induce a mouse model of progressive multiple sclerosis experimental autoimmune encephalomyelitis (PMS-EAE) an emulsion containing 200 µg of MOG₃₅₋₅₅

dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) in an equal volume to complete Freund's adjuvant (CFA) oil supplemented with 400 µg of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra extract^{16,21} was administered by subcutaneous (s.c.) injection in the flank region of the mouse. In the non-immunized mice (control), MOG₃₅₋₅₅ was not added in the mixture.

To induce a mouse model of relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE), an injection (s.c.) of a mixed solution of MOG₃₅₋₅₅ antigen (200 µg) and Quil A (45 µg) in phosphate-buffered saline (PBS) solution (100 µl)^{14,17,22} was administered in the flank region of the mouse. Control mice received only equal doses of Quil A and pertussis toxin^{14,17,22}. All mice received a dose of 300 ng of pertussis toxin intraperitoneally (i.p.), which was re-administrated 48 h after the induction^{16,21}.

2.3 Assessment of EAE clinical signs

The clinical signs of the PMS-EAE model were measured using a clinical scale that evaluated the neurological impairment using scores²¹. Mice were assessed using this scale: grade 0, regular mouse; grade 1, flaccid tail (disease onset); grade 2, mild hindlimb weakness with quick righting reflex; grade 3; severe hindlimb weakness with slow righting reflex; and grade 4, hindlimb paralysis in one hindlimb or both. Mice were monitored on different days after the PMS-EAE model post-induction (p.i.; 3-14 days) to assess the clinical signs.

Similar to the PMS-EAE model, the clinical disease scoring paradigm for RR-EAE induced mice were assessed weekly during the experimental period p.i. (7-35 days) according to the following scale: 0, normal behavior; 0.5, limpness of the distal tail region and hunched appearance; 1, utterly limp tail or developing weakness in the hindlimbs; 1.5, limp tail and distinct hindlimbs weakness recognized by unsteady gait and poor grip of hindlimbs while hanging on cage underside; 2, limp tail with unilateral partial hindlimb paralysis; 2.5, limp tail and partial paralysis of bilateral hindlimbs; 3, complete paralysis of bilateral hindlimbs; 3.5, complete bilateral hindlimbs paralysis and unilateral forelimb paralysis; and 4, quadriplegia. RR-EAE disease was regarded as present if clinical scores ≤ 0.5 indicated no disease or disease remission.

Animals displaying a clinical-grade ≥ 1 (RR-EAE) or ≥ 2 (PMS-EAE), were removed from the study^{16,17,23}. Mice were also monitored after PMS- or RR-EAE induction to

assess weight. If an animal showed a weight loss of 20-30% of the initial weight, the animal was excluded from the experimental setting. No animals were excluded from the study, as also reported in previous studies ^{16,17}.

2.4 Locomotor activity testing

The animal's locomotor activity was observed on different days before and after PMS- or RR-EAE induction. Firstly, the mice were trained on the rotarod apparatus (47650 Rota-Rod NG, Ugo Basile, Italy) one day before induction. Mice were placed on a spinning cylinder for 60 seconds (s), at the fixed speed of 16 rpm, and the latency to fall from the apparatus was recorded. This session was repeated two times. The rotarod test was performed on days 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 14 (PMS-EAE) or 7, 14, 21, 28, and 35 (RR-EAE) ^{21,23,24}. Animals that failed to remain 180 s in the rotarod, were removed from the study ^{16,17,23}.

2.5 Mechanical or cold allodynia evaluation

The development of mechanical allodynia was evaluated by placing the mice in individually transparent boxes on a wire mesh platform allowing easy access to the right hind paw plantar surface. Filaments of different stiffness were applied to the plantar surface of the hind paw, ranging from 0.07 to 2.0 g (0.07, 0.16, 0.40, 0.60, 1.0, 1.4, 2.0 g). According to the up-and-down paradigm, the mechanical threshold ^{25,26} was obtained. This paradigm continued for six measurements, or until four consecutive positive or four consecutive negative responses occurred. The mechanical paw-withdrawal threshold (in g) response was calculated from the resulting scores ²⁷. The animals were acclimatized for 60 min before to determine the baseline thresholds, the test and all animals were assessed before PMS or RR-EAE induction (baseline values). The mechanical threshold was evaluated on days 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 14 (PMS-EAE) or 7, 14, 21, 28, and 35 (RR-EAE) p.i and in control animals.

The cold allodynia was assessed by the acetone test. Acetone (20 μ l) was applied to the plantar surface of the right hind paw, and the time lifting, licking, or wagging the paw was counted for 60 s ²⁸⁻³⁰. Cold allodynia was evaluated before PMS- or RR-EAE

induction and on days 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 14 (PMS-EAE) or 7, 14, 21, 28, and 35 (RR-EAE) p.i. and in control animals.

2.5 Immunofluorescence

Spinal cord (L4-L6) samples were obtained from the *Trpa1^{+/+}* e *Trpa1^{-/-}* PMS- or RR-EAE induced mice. To collect the tissues were transcardially perfused with PBS, followed by 4% paraformaldehyde. Spinal cord samples were removed, postfixed for 24 h, and cryoprotected (4°C, overnight) in 30% sucrose. Cryosections (40 µm) of the spinal cord were incubated (4°C, overnight) with the following primary antibodies: Iba1 [1:1000, Wako, catalog #019–19741, rabbit monoclonal, Wako, JP], GFAP [1:500, Z0334, rabbit monoclonal, DAKO, USA], anti-Olig2 (1:100, MABN50, Millipore, UK) diluted in PBS and 2.5% normal goat serum (NGS). Sections were then incubated with fluorescent secondary antibodies: polyclonal Alexa Fluor® 488, and polyclonal Alexa Fluor® 594 (1:600, Invitrogen) (2 h, room temperature) and coverslipped. The analysis of negative controls (nonimmune serum) was simultaneously performed to exclude the presence of non-specific immunofluorescent staining, crossimmunostaining, or fluorescence bleed-through. Tissues were visualized, and digital images were captured using an Olympus BX51 (Olympus srl). Data are expressed as mean fluorescence intensity (% of basal).

2.6 Luxol fast blue staining

Spinal cord slices were placed in a solution of 1:1 alcohol/chloroform for 2 h and hydrated on 95% ethyl alcohol. After they were let on luxol fast blue solution at 56 °C for 2 h. The differentiation process was made by putting slices in a lithium carbonate solution for 30 sec, 70% ethyl alcohol for 30 sec, and washing with distilled water. This differentiation process was repeated 5-7 times until achieving the best staining. The analysis was made using Image-J (NIH, USA) to measure the stained area.

2.7 Statistical analysis

To calculate the number of the cells/area are used the ZEN 2.6 blue edition (Carl Zeis Microscopy GmbH) program. Data were expressed as mean + SEM and analyzed statistically by the parametric and nonparametric Student t-test, 1-way or 2-way analysis

of variance according to the experimental protocol, followed by the post-test Bonferroni when needed. The individual values were inserted as column statistics in Prism GraphPad and calculated the mean of these values. To meet parametric assumptions, data of mechanical threshold scores were log-transformed before analyses for the mechanical allodynia test. Differences between groups were considered significant when P values were less than 0.05 ($P < 0.05$), using the GraphPad Prism 8.0 program.

3 RESULTS

3.1 TRPA1 deletion prevents the development of mechanical and cold allodynia in RR-EAE mouse model

RR-EAE *Trpa1*^{+/+} mice developed a time-dependent increase in the mechanical allodynia (Fig 1A) from day 21 to 35 p.i.. In addition to mechanical allodynia, RR-EAE *Trpa1*^{+/+} mice also developed cold allodynia (Fig 1B). Mice with genetic deletion of TRPA1 did not develop either mechanical or cold allodynia after induction compared to *Trpa1*^{+/+} mice (Fig 1A-B). TRPA1 deletion suggests the prevention of the neuropathic pain-like symptoms.

The mouse body weight did not present a significant difference (Fig 1C) during the experiment days for all the groups. Furthermore, all experimental groups did not present significant locomotor activity changes when assessed in the rotarod test (Fig. 1D).

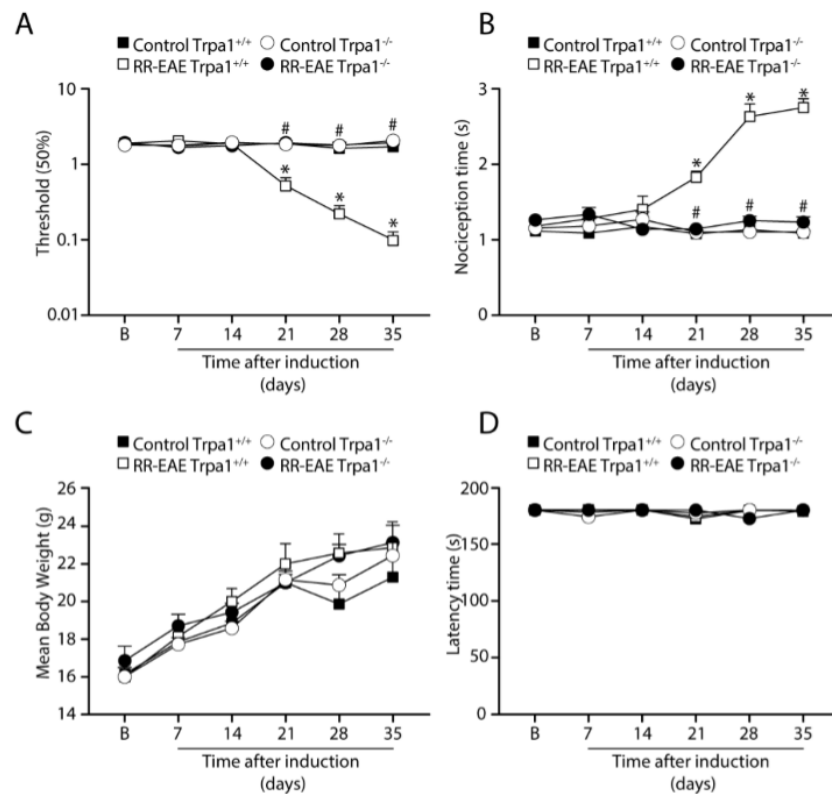


Fig 1. TRPA1 deletion prevents the development of mechanical and cold allodynia after relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE) mouse model. Evaluation of (A) mechanical allodynia, (B) cold allodynia, (C) body weight, and (D) latency to fall in the rotarod test. Data are mean + SEM (n=6) for Graphs A-D. * P < 0.05, when compare to Control *Trpa1*^{+/+} group vs. relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (PMS-EAE) *Trpa1*^{+/+} group; and # P < 0.05 when compared to PMS-EAE *Trpa1*^{+/+} group vs. RR-EAE *Trpa1*^{-/-} group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

3.2 TRPA1 deletion also prevents the development of mechanical and cold allodynia after PMS-EAE induction

In the PMS-EAE model, the induced *Trpa1*^{+/+} mice also showed the development of mechanical and cold allodynia (Fig 2). Similar to RR-EAE model, PMS-EAE *Trpa1*^{-/-}

mice showed prevention to mechanical (Fig 2A) and cold (Fig 2B) allodynia compared to the PMS-EAE *Trpa1*^{+/+} mice. Moreover, the bodyweight of both strains did not present a significant difference between PMS-EAE or control groups (Fig 2C). All the animals did not present locomotor activity changes when assessed in the rotarod test (Fig 2D).

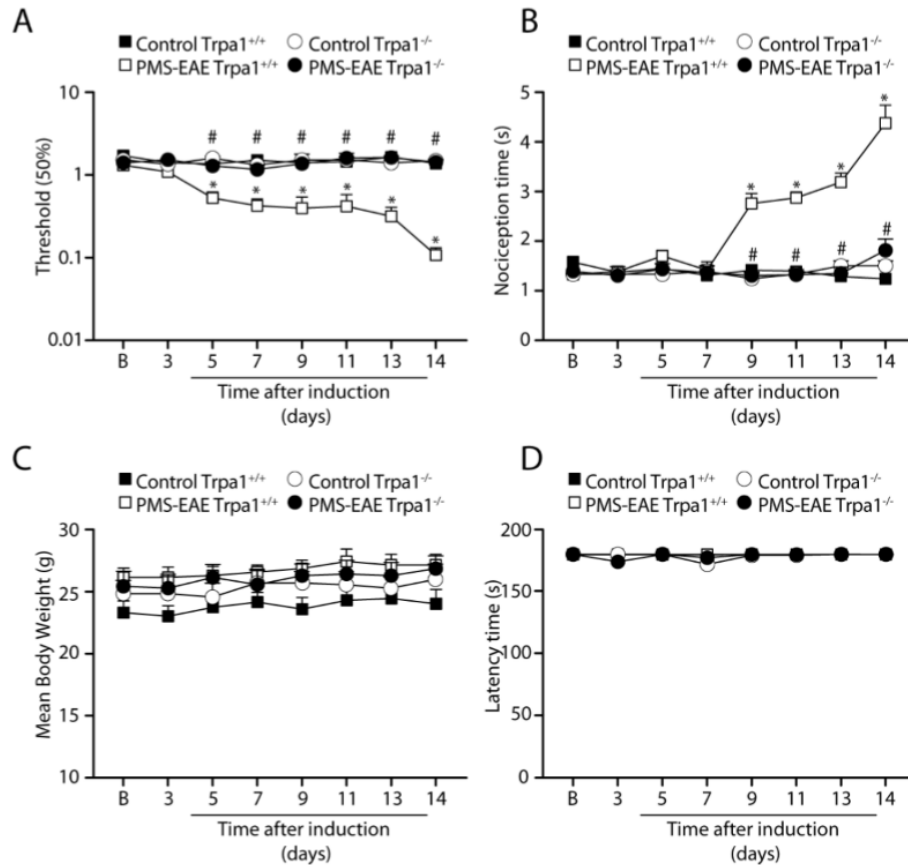


Fig 2. TRPA1 deletion also prevents the development of mechanical and cold allodynia after progressive multiple sclerosis induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (PMS-EAE) induction. Evaluation of (A) mechanical allodynia, (B) cold allodynia, (C) body weight, and (D) latency to fall in the rotarod test. Data are mean + SEM (n=6) for Graphs A-D. * P <0.05, when compared to Control *Trpa1*^{+/+} group vs. progressive multiple sclerosis induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (PMS-EAE) *Trpa1*^{+/+} group; and # P <0.05 when compared to PMS-EAE *Trpa1*^{+/+} group vs. PMS-EAE *Trpa1*^{-/-} group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

3.3 Iba1 marker was reduced in the spinal cord of *Trpa1*^{-/-} mice induced to RR- or PMS-EAE models

We also explored the Iba1 marker, a microglial and macrophage-specific calcium-binding protein, and analyzed its expression in the two multiple sclerosis models. After the RR-EAE induction (Fig 3), the counting of Iba1⁺ cell was increased in *Trpa1*^{+/+} mice, and *Trpa1*^{-/-} mice did not present alterations in Iba1⁺ cell in the spinal cord total area and dorsal horn area (Fig 3A-C). The PMS-EAE induction elicited the increase of Iba1⁺ cell only in *Trpa1*^{+/+} induced mice in the total spinal cord area and dorsal horn area compared to *Trpa1*^{-/-} PMS-EAE mice (Fig 3D-F).

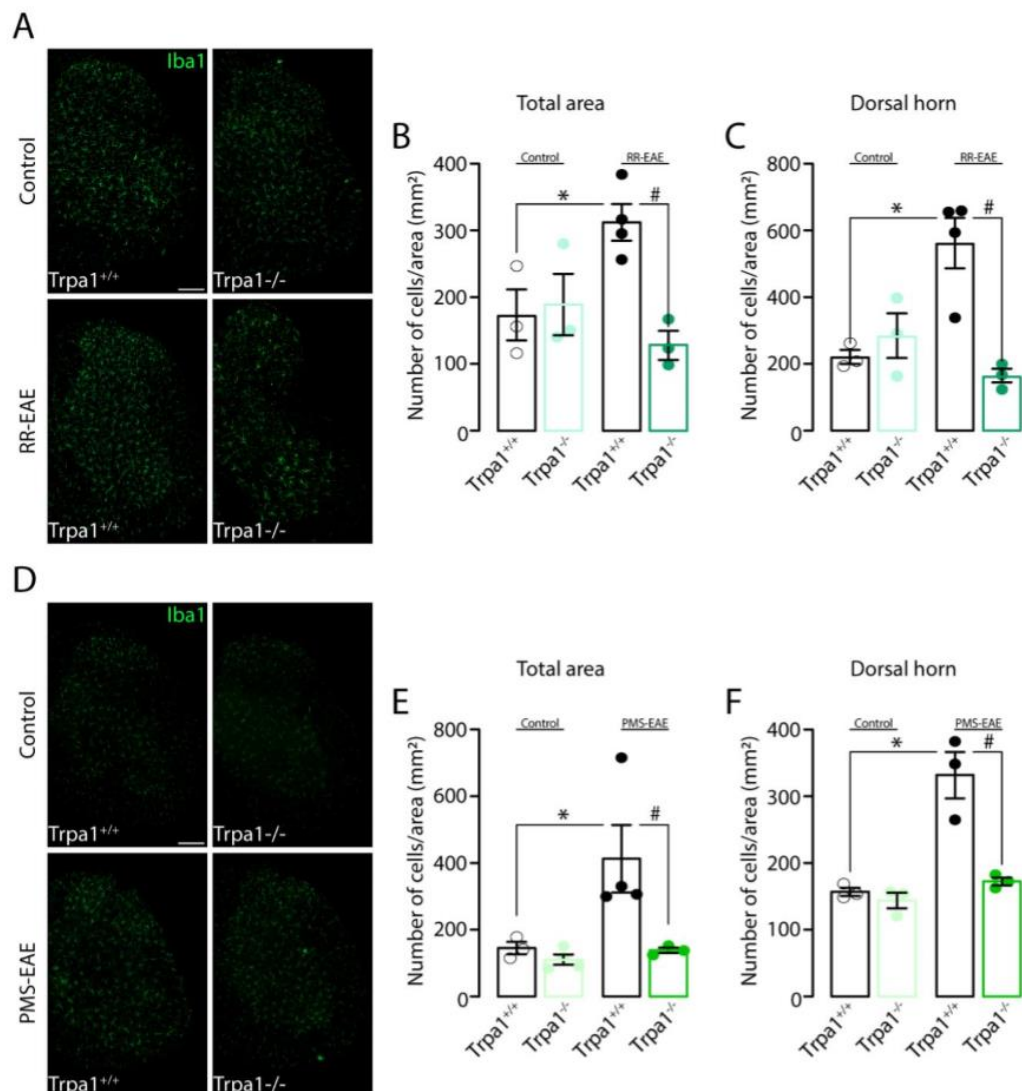


Fig 3. Iba1 was reduced in the spinal cord of *Trpa1*^{-/-} mice induced to RR-EAE or PMS-EAE. (A) Representative photomicrographs of spinal cord area for *Trpa1*^{+/+} or *Trpa1*^{-/-} after RR-EAE, (B) the number of cells/area for total spinal cord, (C) number of cell/area dorsal horn, (D) representative photomicrographs of spinal cord area for *Trpa1*^{+/+} or *Trpa1*^{-/-} after PMS-EAE, (E) number of cells/area for the total spinal cord, and (F) number of cell/area dorsal horn. Data are mean + SEM (n=4) for Graphs A-F. * P < 0.05, when compared to Control *Trpa1*^{+/+} group vs. RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1*^{+/+} group; and

P <0.05 when compared to RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1*^{+/+} group vs. PMS-EAE *Trpa1*^{-/-} group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

3.4 The astrocyte marker (GFAP) was reduced in the spinal cord of mice *Trpa1*^{-/-} induced to RR- or PMS-EAE models

We also investigated the mechanism underlying the astrocyte activation and compared the two multiple sclerosis models to TRPA1 expression (Fig 4). The increase in GFAP⁺ cell numbers documented in *Trpa1*^{+/+} was reduced in *Trpa1*^{-/-} mice in the total spinal cord area and dorsal horn area (Fig 4A-C) after the RR-EAE induction. Similar results were observed in mice induced to PMS-EAE. The increase of GFAP⁺ cell numbers in *Trpa1*^{+/+} induced mice in the spinal cord total area and dorsal horn area (Fig 4D-F) was reduced in *Trpa1*^{-/-} induced mice.

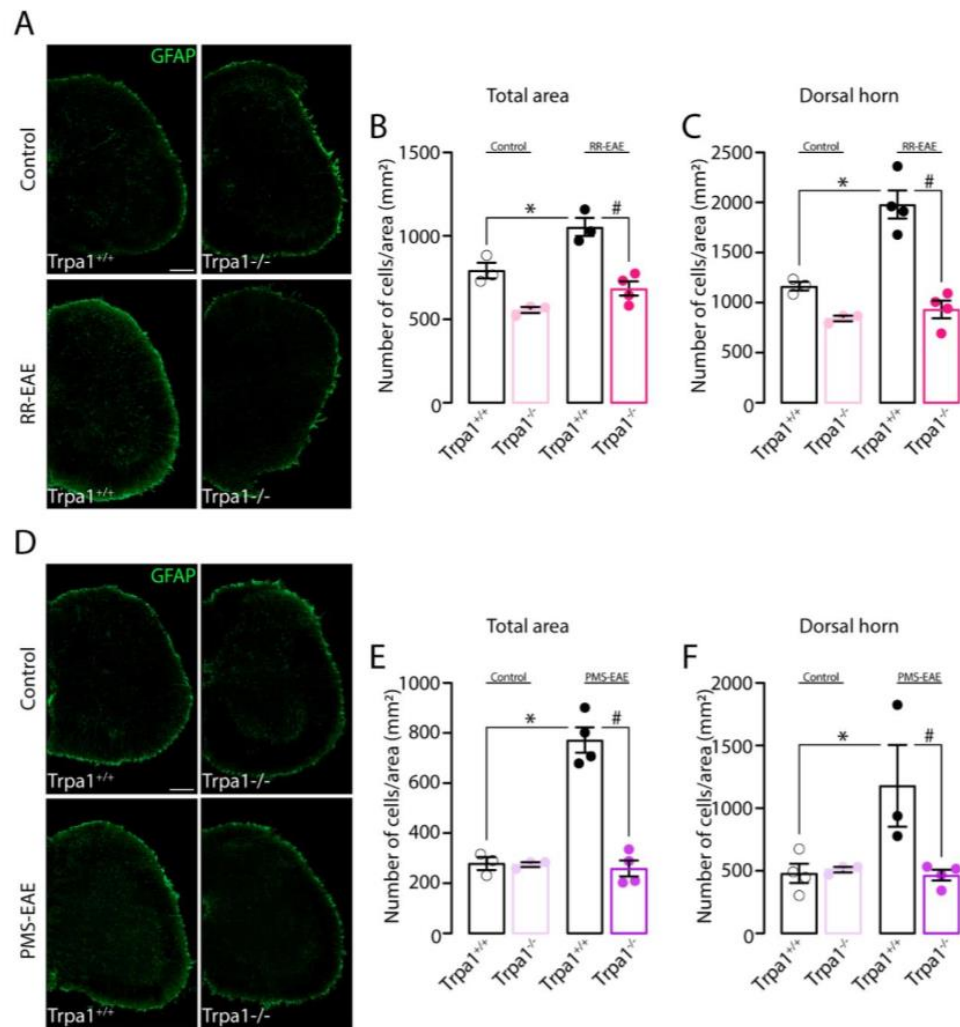


Fig 4. The astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) was reduced in the spinal cord of *Trpa1*^{-/-} mice induced to relapsing-remitting or progressive multiple sclerosis by experimental autoimmune encephalomyelitis. (A) Representative photomicrographs of spinal cord area for *Trpa1*^{+/+} or *Trpa1*^{-/-} after relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE), (B) the number of cells/area for total spinal cord, (C) number of cell/area dorsal horn, (D) representative photomicrographs of spinal cord area for *Trpa1*^{+/+} or *Trpa1*^{-/-} after progressive multiple sclerosis induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (PMS-EAE) (E)

number of cells/area for the total spinal cord, and (F) number of cell/area dorsal horn. Data are mean + SEM (n=4) for Graphs A-F. * P <0.05, when compared to Control *Trpa1^{+/+}* group vs. RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1^{+/+}* group; and # P <0.05 when compared to RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1^{+/+}* group vs. PMS-EAE *Trpa1^{-/-}* group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

3.5 *Trpa1^{-/-}* mice presented a prevention of demyelinating process after RR- or PMS-EAE induction by luxol fast blue staining, but the deletion did not prevent the development of clinical scores.

Here, the development of clinical signs for RR- or PMS-EAE (Fig 5A-B) mice was the same for *Trpa1^{+/+}* or *Trpa1^{-/-}*, demonstrating the absence of prevention to knockout mice in these inductions. However, luxol fast blue staining (myelin marker) showed the reduction of myelin after *Trpa1^{+/+}* RR- (Fig 5E) and PMS-EAE (Fig F) induction that suggest a prevention of demyelinating process in *Trpa1^{-/-}* RR- and PMS-EAE induced mice.

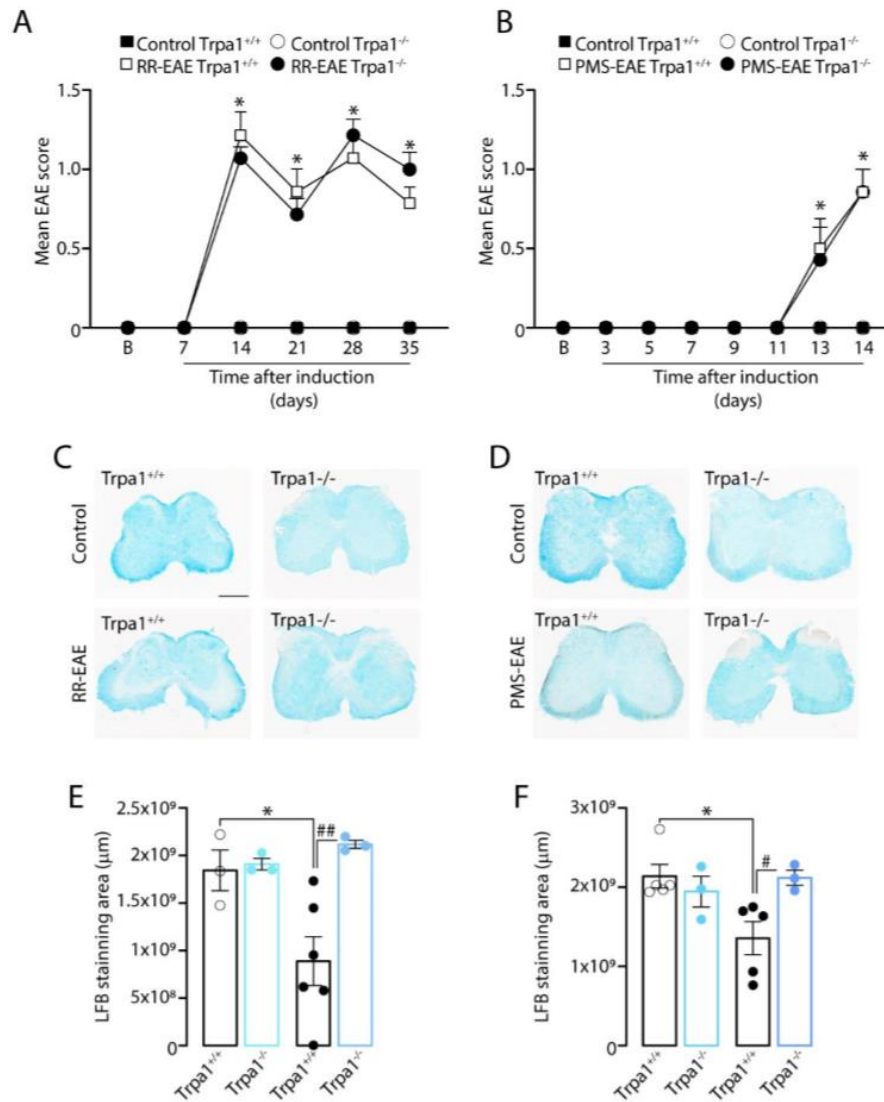


Fig 5. *Trpa1*^{-/-} mice presented a prevention of demyelinating process after RR- or PMS-EAE induction by luxol fast blue staining, but the deletion did not prevent the development of clinical scores. (A) Clinical scores in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE); (B) Clinical scores in progressive multiple sclerosis induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (PMS-EAE); (C) Representative photomicrographs of luxol fast blue staining for RR-EAE; (D) Representative photomicrographs of luxol fast blue staining for PMS-EAE; (E) Luxol fast

blue staining for RR-EAE; (F) Luxol fast blue staining for PMS-EAE Data are mean for Graphs A-B and + SEM (n=6) and Graphs E-F (n=4) * P <0.05, when compared to Control *Trpa1^{+/+}* group vs. RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1^{+/+}* group; and # P <0.05 when compared to RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1^{+/+}* group vs. PMS-EAE *Trpa1^{-/-}* group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

3.6 *Trpa1^{-/-}* mice showed a prevention of demyelinating process after RR- or PMS-EAE induction by Olig-2, a oligodendrocyte proliferation marker.

A decrease of oligodendrocyte proliferation marker, Olig2, was observed in the total area (Fig 6B) and dorsal horn (Fig 5C) of the spinal cord from *Trpa1^{+/+}* RR-EAE induced mice. Surprisingly, the TRPA1 deletion might support a prevention of demyelinating process observed by upregulation of Olig2 of *Trpa1^{-/-}* RR-EAE induced mice in total area (Fig 5B) and dorsal horn (Fig 5C) of the spinal cord. A similar prevention was observed in the number of Olig2⁺ cells of PMS-EAE induced mice in total area (Fig 5E) and dorsal horn (Fig 5F) of the spinal cord.

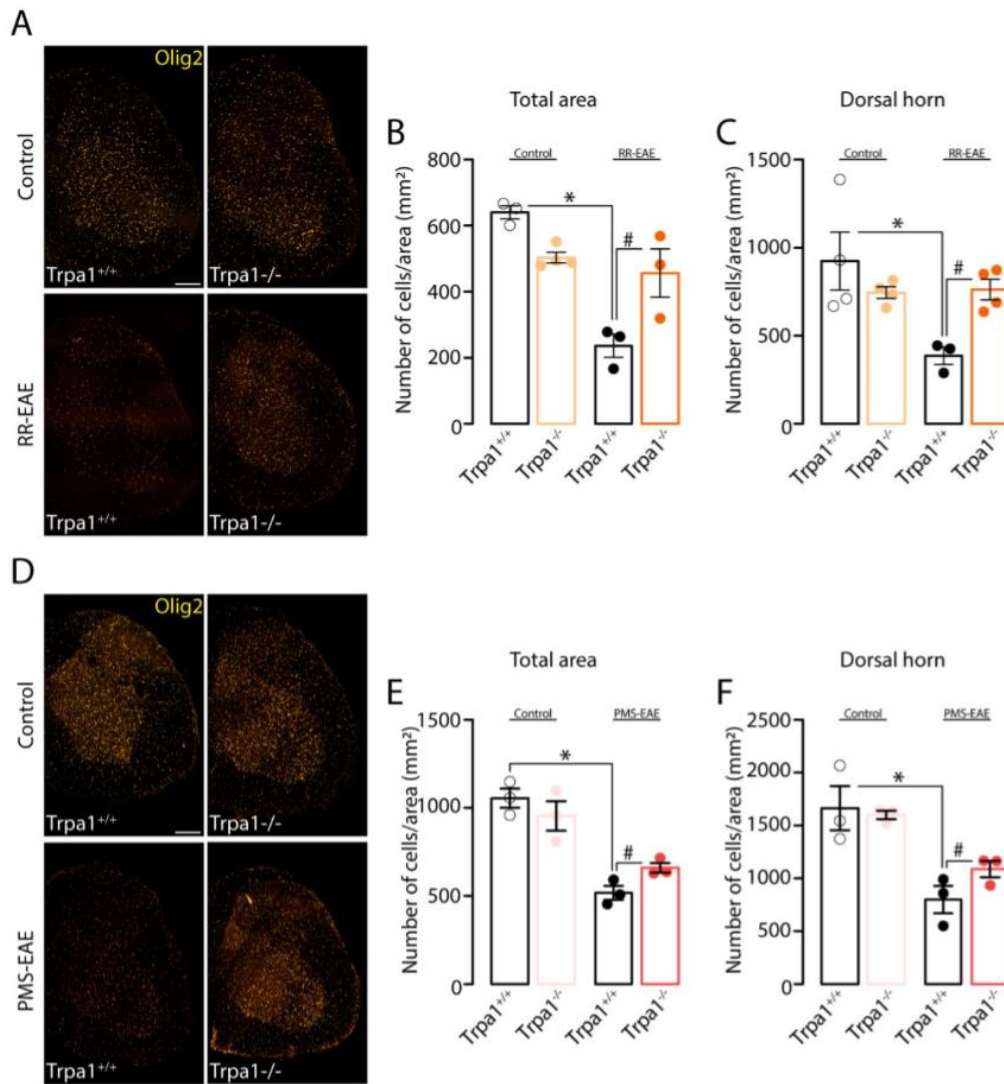


Fig 6. *Trpa1*^{-/-} mice showed a prevention of demyelinating process after RR- or PMS-EAE induction by Olig-2, an oligodendrocyte proliferation marker. (A) Representative photomicrographs of spinal cord area for *Trpa1*^{+/+} or *Trpa1*^{-/-} after relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (RR-EAE), (B) the number of cells/area for total spinal cord, (C) number of cell/area dorsal horn, (D) representative photomicrographs of spinal cord area for *Trpa1*^{+/+} or *Trpa1*^{-/-} after progressive multiple sclerosis induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (PMS-EAE) (E)

number of cells/area for the total spinal cord, and (F) number of cell/area dorsal horn. Data are mean + SEM (n=4) for Graphs A-F. * P <0.05, when compared to Control *Trpa1^{+/+}* group vs. RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1^{+/+}* group; and # P <0.05 when compared to RR-EAE or PMS-EAE *Trpa1^{+/+}* group vs. PMS-EAE *Trpa1^{-/-}* group [Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test].

DISCUSSION

The role of TRPA1 channel in the development of pain symptoms has been extensively investigated³¹. In addition, the different EAE induction is the most common MS rodent model used in the research field due to its clinical and pathological similarities of the disease, which include neuroinflammation, demyelination, and neuron loss³². Previously, we showed that the administration of TRPA1 antagonists transiently reduced the mechanical and cold allodynia developed after the RR- or PMS-EAE inductions^{16,17}. Here, first we confirm the involvement of TRPA1 in the the mechanical and cold allodynia in the two different model of MS, the RR- or PMS-EAE model, by using TRPA1 deleted mice. Second, we also to investigate the involvement of TRPA1 in the central neuroinflammation after the induction of two EAE mouse models.

TRPA1 genetic deletion prevents the development of mechanical and cold allodynia either in the RR- or PMS-EAE mouse model. However, the TRPA1 deletion could not prevent the development of clinical scores but prevent or suggest a remyelinating process after RR- or PMS-EAE induction. Furthermore, TRPA1 deletion significantly reduced the levels of neuroinflammatory markers, Iba1 and GFAP, in spinal cord tissues which were increased in *Trpa1^{+/+}* following PMS- or RR-EAE. Using a genetic approach by the TRPA1 total deletion, these findings suggest an essential role of TRPA1 in neuropathic pain-like symptoms and neuroinflammation responses in the two different model of MS.

Neuropathic pain is one of the most prevalent pain symptoms by MS patients^{33,34}. Different mouse models of neuropathic pain showed that TRPA1 deletion reduced the mechanical allodynia in the paw and periorbital area^{12,13,30,35,36}. In alcoholic neuropathy and partial sciatic nerve ligation model, the TRPA1 total deletion or its specific silencing in Schwann cells prevented the development of mechanical and cold allodynia^{12,35}. In

addition, TRPA1 deleted mice did not develop mechanical and cold allodynia in other model of neuropathic pain, including the chemotherapy induced peripheral neuropathy,³⁶ and complex regional pain syndrome¹³ models. Furthermore, the development of periorbital mechanical allodynia by the constriction of the infraorbital nerve was also attenuated following TRPA1 deletion³⁰. Here, in agreement with all the previous neuropathic pain models, the total deletion of the TRPA1 channel was also able to prevent the development of cold and mechanical allodynia after RR- or PMS-EAE induction. These results corroborate our previous results obtained following the TRPA1 pharmacologic blockade (by two selective TRPA1 antagonists, HC-030031 and A967079) in the PMS and RR-EAE mouse models^{16,17}.

TRPA1 receptors are expressed in CNS on astrocytes^{10,37,38}, oligodendrocytes¹¹, and macrophages³⁹. The activation of astrocytes, microglia, and oligodendrocytes has emerged as a leading mechanism underlying chronic pain⁴⁰. Several studies showed the upregulation of glial markers such as Iba1 and GFAP⁴⁰ and cell morphological alterations, including hypertrophy and/or proliferation. Accordingly, three different studies using the EAE mouse model showed an upregulation of Iba1 markers in induced mice^{14,41,42}. In particular, the Iba1+ microglia/macrophages indicate a significant role of these cells in the neuroinflammatory process induced by the CFA-EAE model in the corpus callosum⁴¹. In the same induction protocol for RR-EAE, the increase in the Iba1 marker in the corpus callosum and spinal cord was also shown¹⁴. Other evidence established a relation among TRPA1 activation, Iba1 marker, and nociception behavior⁴³. In a previous study, the TRPA1 deletion prevented the microglia activation, by modulating the Iba1, in a pain model induced by bradykinin B1 receptor agonist, thus revealing an important role of this channel in this type of nociceptive behavior⁴³. Furthermore, some neuropathic models, such as chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve^{44,45} and CIPN⁴⁶ displayed the development of mechanical allodynia in induced-mice as well as an increase of Iba1 marker in spinal cord. Our previous results obtained by real-time PCR showed the enhancement of Iba-1 mRNA levels in the RR-EAE model¹⁷. Here, we indicate that the TRPA1 deletion could prevent the increase of the Iba1+ cells caused by RR- and PMS-EAE induction in the spinal cord.

Astrocytes lead diverse functions in the CNS, and some evidence showed their essential role in neurodegenerative diseases, such as MS^{47,48}. Other findings showed the importance of the astrocytes in MS, which influences the clinical phenotypes, pathogenesis, progression, and recovery of this pathology⁴⁷. The TRPA1 is also expressed in astrocytes, and a recent study reported its contribution to forming early A β oligomers toxicity by Ca²⁺ hyperactivity Alzheimer's disease mouse model⁴⁹. Other results demonstrated the role of TRPA1 activation in the neuroinflammatory process, by increasing GFAP, in Alzheimer's disease mouse model⁵⁰. Different findings, using the EAE mouse models, showed the upregulation of GFAP^{14,51}, which correlate with MS pathophysiology. The increase in GFAP expression were also related to pain-like behaviors, such as in a model of neuropathic pain by spinal cord ligation, where the GFAP expression was upregulated and involved in the development of mechanical allodynia⁵²⁻⁵⁴. Here, the deletion of TRPA1 prevents the increase of GFAP+ve cells observed in the wild-type mice induced to both MS mouse models.

The demyelinating process and oligodendrocyte damage in MS results in impairment of neuron impulse propagation and, consequently, several functional deficits⁵⁵. As previously described, the EAE models could induce the demyelinating process, which manifests motor impairments mimicking the MS clinical manifestations^{32,56}. Here, we observed the presence of clinical scores after PMS or RR-EAE induced mice. However, the deletion of TRPA1 channels did not prevent the development of these clinical signs. Similar results were also observed in another EAE model, where the blocked of toll-like receptors 2 and 4 could not reduce the motor impairments but reversed the allodynia caused by EAE induction⁵⁷.

The Olig2 marker is highly expressed in motor neurons and oligodendrocytes and leads to the differentiation and maturation of oligodendrocyte progenitor cells⁵⁸. This transcript factor regulates myelin regeneration during chronic demyelination and is an important marker for investigating the possible new targets to restore the myelination⁵⁸. In the cuprizone model, it was observed that the demyelination was related to a reduction in luxol fast blue staining and a significant reduction of the cells numbers marked by Olig2⁵⁹. Here, we reported a reduction in Olig2 and luxol fast blue staining in the spinal cord in PMS and RR-EAE induced mice, and TRPA1 deletion showed prevention of

demyelinating process. Thus, our results suggest that TRPA1 channel blockade might help in the remyelinating process, although it is insufficient to recover both induction's clinical scores.

Several cell types and proteins are involved in the inflammatory and degenerative processes involved in the development of neurodegenerative diseases⁶⁰. Previous results and our current findings suggest a possible role of the TRPA1 in the inflammatory process and attenuation of neuropathic pain-like behaviors using two different mouse models of multiple sclerosis^{16,17,61,62}. Further, the reported findings strongly support TRPA1 channel is a valuable target for future investigations to treat neuropathic pain in MS patients.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

Role of the funding source

The funding source was not involved in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Author contributions

All the authors discussed the results, commented on the manuscript, and approved this final version.

1) Substantial contributions to conception and design, data acquisition, analysis, and interpretation: Diéssica Padilha Dalenogare, Daniel Souza Monteiro de Araújo, Lorenzo Landini, Mustafa Titz, Gaetano De Siena, Francesco De Logu.

2) Drafting and critically revising the article for important intellectual content: Diéssica Padilha Dalenogare, Daniel Souza Monteiro de Araújo, Lorenzo Landini, Mustafa Titz, Gaetano De Siena, Francesco De Logu, Pierangelo Geppetti, Romina Nassini, Gabriela Trevisan.

3) Final article approval: Diéssica Padilha Dalenogare, Daniel Souza Monteiro de Araújo, Lorenzo Landini, Mustafa Titz, Gaetano De Siena, Francesco De Logu, Pierangelo Geppetti, Romina Nassini, Gabriela Trevisan.

4) Acquisition of funding and general supervision of the research group: Romina Nassini, Pierangelo Geppetti, Gabriela Trevisan.

Acknowledgements

Fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are also acknowledged. Diéssica Padilha Dalenogare fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [process # 88882.428089/2019-01] and Programa Institucional de Internacionalização CAPES [process #88887.374020/2019-00]. Gabriela Trevisan is recipient of a fellowship from CNPq [process #303531/2020-7], L'ORÉAL - ABC - UNESCO Para Mulheres na Ciência, 2016 and Prêmio Capes de Teses - Ciências Biológicas II, CAPES, 2014 [process #23038.006930/2014/59]. This work was also supported by European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement No. 835286) (Pierangelo Geppetti).

REFERENCES

1. Thompson, Banwell B, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria THOMPSON, A. J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, v. 17, n. 2, p. 162–173, 2018. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
2. Thompson, Baranzini S, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2018;391(10130):1622-1636. doi:10.1016/S0140-6736(18)30481-1
3. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology.* 2014;83(3):278-286. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
4. Koldbro A, Kumar D, Olesen J, Jørn L, Jansen-olesen I. *Pharmacological Reports*

- Effect of TRPA1 activator allyl isothiocyanate (AITC) on rat dural and pial arteries. *Pharmacol Reports*. 2019;71(4):565-572. doi:10.1016/j.pharep.2019.02.015
5. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(33):13519-13524. doi:10.1073/pnas.0705923104
 6. Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci*. 2008;27(5):1131-1142. doi:10.1111/J.1460-9568.2008.06093.X
 7. Akopian AN. Regulation of Nociceptive Transmission at the Periphery Via TRPA1-TRPV1 Interactions. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010;12(1):89-94. doi:10.2174/138920111793937952
 8. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003;112(6):819-829. doi:10.1016/s0092-8674(03)00158-2
 9. Fernandes E, Fernandes M, Keeble J. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol*. 2012;166(2):510-521. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x
 10. Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Baljit SK. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci*. 2011;15(1):70-80. doi:10.1038/NN.3000
 11. Hamilton NB, Kolodziejczyk K, Kougioumtzidou E, Attwell D. Proton-gated Ca²⁺-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature*. 2016;529(7587):523-527. doi:10.1038/nature16519
 12. De Logu F, Nassini R, Materazzi S, et al. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nat Commun*. 2017;8(1):1887. doi:10.1038/s41467-017-01739-2
 13. De Logu F, De Prá SD-TT, de David Antoniazzi CT, et al. Macrophages and Schwann cell TRPA1 mediate chronic allodynia in a mouse model of complex regional pain syndrome type I. *Brain Behav Immun*. 2020;88:535-546. doi:10.1016/J.BBI.2020.04.037

14. Khan N, Woodruff TM, Smith MT. Establishment and characterization of an optimized mouse model of multiple sclerosis-induced neuropathic pain using behavioral, pharmacologic, histologic and immunohistochemical methods. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;126:13-27. doi:10.1016/j.pbb.2014.09.003
15. Kriszta G, Nemes B, Sándor Z, et al. Investigation of Cuprizone-Induced Demyelination in mGFAP-Driven Conditional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Receptor Knockout Mice. *Cells.* 2019;9(1):81. doi:10.3390/cells9010081
16. Ritter C, Dalenogare DP, de Almeida AS, et al. Nociception in a Progressive Multiple Sclerosis Model in Mice Is Dependent on Spinal TRPA1 Channel Activation. *Mol Neurobiol.* 2020;57(5):2420-2435. doi:10.1007/s12035-020-01891-9
17. Dalenogare DP, Theisen MC, Peres DS, et al. TRPA1 activation mediates nociception behaviors in a mouse model of relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol.* 2020;328:113241. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113241
18. Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, et al. TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. *Neuron.* 2006;50(2):277-289. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.042
19. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16(2):109-110. doi:10.1016/0304-3959(83)90201-4
20. Mcgrath JC, Lilley E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. 2015. doi:10.1111/bph
21. Olechowski CJ, Truong JJ, Kerr BJ. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain.* 2009;141(1-2):156-164. doi:10.1016/j.pain.2008.11.002
22. Khan N, Gordon R, Woodruff TM, Smith MT. Antiallodynic effects of alpha lipoic acid in an optimized RR-EAE mouse model of MS-neuropathic pain are accompanied by attenuation of upregulated BDNF-TrkB-ERK signaling in the dorsal horn of the spinal cord. *Pharmacol Res Perspect.* 2015;3(3):e00137. doi:10.1002/prp2.137

23. Olechowski CJ, Tenorio G, Sauve Y, Kerr BJ. Changes in nociceptive sensitivity and object recognition in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp Neurol*. 2013;241:113-121. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2012.12.012
24. Olechowski CJ, Parmar A, Miller B, et al. A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain*. 2010;149(3):565-572. doi:10.1016/j.pain.2010.03.037
25. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55-63. doi:10.1016/0165-0270(94)90144-9
26. Tonello R, Rigo F, Gewehr C, et al. Action of Ph α 1 β , a peptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the analgesic and adverse effects caused by morphine in mice. *J Pain*. 2014;15(6):619-631. doi:10.1016/j.jpain.2014.02.007
27. Dixon WJ. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1980;20(1):441-462. doi:10.1146/annurev.pa.20.040180.002301
28. Nassini R, Gees M, Harrison S, et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. *Pain*. 2011;152(7):1621-1631. doi:10.1016/j.pain.2011.02.051
29. Trevisan G, Materazzi S, Fusi C, et al. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. *Cancer Res*. 2013;73(10):3120-3131. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4370
30. Trevisan G, Benemei S, Materazzi S, et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes / macrophages and oxidative stress. *Brain*. 2016;139(5):1361-1377. doi:10.1093/brain/aww038
31. Nassini R, Materazzi S, Benemei S, Geppetti P. The TRPA1 Channel in Inflammatory and Neuropathic Pain and Migraine. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol 167. Germany: Berlin, New York, Springer-Verlag; 2014:1-43. doi:10.1007/112_2014_18
32. Bjelobaba I, Begovic-Kupresanin V, Pekovic S, Lavrnja I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 2018;96(6):1021-1042. doi:10.1002/jnr.24224

33. Solaro C, Messmer Uccelli M. Management of pain in multiple sclerosis: a pharmacological approach. *Nat Rev Neurol.* 2011;7(9):519-527. doi:10.1038/nrneurol.2011.120
34. Foley PL, Vesterinen HM, Laird BJ, et al. Prevalence and natural history of pain in adults with multiple sclerosis: Systematic review and meta-analysis. *Pain.* 2013;154(5):632-642. doi:10.1016/j.pain.2012.12.002
35. De Logu F, Li Puma S, Landini L, et al. Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice. *J Clin Invest.* 2019. doi:10.1172/jci128022
36. Materazzi S, Fusi C, Benemei S, et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2012;463(4):561-569. doi:10.1007/s00424-011-1071-x
37. Lee SM, Cho YS, Kim TH, et al. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *J Chem Neuroanat.* 2012;45(1-2):45-49. doi:10.1016/j.jchemneu.2012.07.003
38. Sághy É, Sipos É, Ács P, et al. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination??A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia.* 2016;64(12):2166-2180. doi:10.1002/glia.23051
39. Naert R, López-Requena A, Talavera K. TRPA1 Expression and Pathophysiology in Immune Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11460. doi:10.3390/ijms222111460
40. Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? In: *Pain.* Vol 154. Pain; 2013. doi:10.1016/j.pain.2013.06.022
41. Burns T, Miers L, Xu J, et al. Neuronopathy in the motor neocortex in a chronic model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73(4):335-344. doi:10.1097/NEN.0000000000000058
42. Chinnasamy P, Lutz SE, Riascos Bernal DF, et al. Loss of allograft inflammatory factor-1 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by limiting encephalitogenic CD4 T-cell expansion. *Mol Med.* 2015;21(1):233-241. doi:10.2119/molmed.2014.00264

43. Meotti FC, Figueiredo CP, Manjavachi M, Calixto JB. The transient receptor potential ankyrin-1 mediates mechanical hyperalgesia induced by the activation of B1 receptor in mice. *Biochem Pharmacol.* 2017;125:75-83. doi:10.1016/J.BCP.2016.11.003
44. Kwiatkowski K, Pawlik K, Ciapała K, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. Bidirectional Action of Cenriciviroc, a CCR2/CCR5 Antagonist, Results in Alleviation of Pain-Related Behaviors and Potentiation of Opioid Analgesia in Rats With Peripheral Neuropathy. *Front Immunol.* 2020;11:3337. doi:10.3389/fimmu.2020.615327
45. Rojewska E, Piotrowska A, Makuch W, Przewlocka B, Mika J. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. *Neuropharmacology.* 2016;102:80-91. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.040
46. Makker PGS, Duffy SS, Lees JG, et al. Characterisation of immune and neuroinflammatory changes associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *PLoS One.* 2017;12(1). doi:10.1371/journal.pone.0170814
47. Yi W, Schlüter D, Wang X. Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity. *Brain Behav Immun.* 2019;80:10-24. doi:10.1016/j.bbi.2019.05.029
48. Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron.* 2020;108(4):608-622. doi:10.1016/j.neuron.2020.08.012
49. Bosson A, Paumier A, Boisseau S, Jacquier-Sarlin M, Buisson A, Albrieux M. TRPA1 channels promote astrocytic Ca²⁺ hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):53. doi:10.1186/s13024-017-0194-8
50. Lee K-I, Lee H-T, Lin H-C, et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):92. doi:10.1186/s12974-016-0557-z
51. Doolen S, Iannitti T, Donahue RR, Shaw BC, Grachen CM, Taylor BK. Fingolimod reduces neuropathic pain behaviors in a mouse model of multiple sclerosis by a sphingosine-1 phosphate receptor 1-dependent inhibition of central sensitization in the dorsal horn. *Pain.* 2018;159(2):224-238.

- doi:10.1097/j.pain.0000000000001106
52. Guo J, Jia D, Jin B, Xu F, Yuan X, Shen H. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor intrathecal injection on spinal dorsal horn glial fibrillary acidic protein expression in a rat model of neuropathic pain. *Int J Neurosci*. 2012;122(7):388-394. doi:10.3109/00207454.2012.672500
 53. Wang J, Zeng L, Zhou Q, et al. L6 spinal nerve ligation produces prolonged development of mechanical allodynia and gradual increase of GFAP on ipsilateral dorsal horn. *Acta Neurochir (Wien)*. 2013;155(5):935-940. doi:10.1007/s00701-012-1616-6
 54. Vieira MC, de Mello Monte FB, Dematte BE, et al. Antinociceptive Effect of Lodenafil Carbonate in Rodent Models of Inflammatory Pain and Spinal Nerve Ligation-Induced Neuropathic Pain. *J Pain Res*. 2021;14:857-866. doi:10.2147/JPR.S295265
 55. Gruchot J, Weyers V, Göttle P, et al. The Molecular Basis for Remyelination Failure in Multiple Sclerosis. *Cells*. 2019;8(8). doi:10.3390/cells8080825
 56. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1079-1106. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x
 57. Kwilas AJ, Green Fulgham SM, Duran-Malle JC, et al. Toll-like receptor 2 and 4 antagonism for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-related pain. *Brain Behav Immun*. 2021;93:80-95. doi:10.1016/j.bbi.2020.12.016
 58. Othman A, Frim DM, Polak P, et al. Olig1 is expressed in human oligodendrocytes during maturation and regeneration. *Glia*. June 2011;914-926. doi:10.1002/glia.21163
 59. Safaei HA, Eftekhari SM, Aliomrani M. Analysis of platelet-derived growth factor receptor A and oligodendrocyte transcription factor 2 markers following Hydroxychloroquine administration in animal induced multiple sclerosis model. *Metab Brain Dis*. 2021;36(7):2101-2110. doi:10.1007/s11011-021-00802-8
 60. Lee K, Jo YY, Chung G, Jung JH, Kim YH, Park CK. Functional Importance of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Neurological Disorders. *Front Cell*

Dev Biol. 2021;9. doi:10.3389/fcell.2021.611773

61. Brambilla R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 2019;137(5):757-783. doi:10.1007/s00401-019-01980-7
62. Dutra RC, Bento AF, Leite DFP, et al. The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: Evidence for the involvement of astrocytes. *Neurobiol Dis.* 2013;54:82-93. doi:10.1016/j.nbd.2013.02.007

5 DISCUSSÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurológica complexa e crônica que leva a déficits motores, sensoriais e cognitivos (MIRABELLI; ELKABES, 2021). Os sintomas da EM são imprevisíveis e variáveis. A dor é um sintoma frequente da EM e manifesta-se mesmo nos estágios iniciais da doença. A dor neuropática e a enxaqueca são as alterações sensoriais mais debilitantes que reduzem a qualidade de vida e interfere na atividades diárias, principalmente porque as farmacoterapias convencionais não são eficazes nesses sintomas (HUSAIN; PARDO; RABADI, 2018; MIRABELLI; ELKABES, 2021).

Desta maneira, no presente estudo, foi investigado o envolvimento do TRPA1 no desenvolvimento de sintomas do tipo dor neuropática central e tipo enxaqueca em um modelo de EMRR em camundongos. Como primeiros achados confirmou-se o desenvolvimento de sinais clínicos da doença RR-EAE, os quais já haviam sido padronizados em estudo anterior (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014), sem comprometimento motor e a presença das alterações características da EMRR. Na análise de parâmetros biomoleculares, observou-se a diminuição dos marcadores de mielina e aumento de marcadores de neuroinflamação em amostras de medula espinal. Também foi observado o desenvolvimento de comportamentos do tipo dor neuropática evocados na região da pata e do tipo enxaqueca na região periorbital. Também, os antagonistas do TRPA1 apresentaram efeito antinociceptivo em animais induzidos ao modelo de EAE-RR. Já está bem descrito na literatura que o desenvolvimento de alodinia mecânica periorbital e em outras áreas cutâneas é considerado uma característica de crises de enxaqueca (EBERHARDT et al., 2014; HUSAIN; PARDO; RABADI, 2018). Deste modo, neste estudo foi demonstrado pela primeira vez o desenvolvimento de alodinia mecânica periorbital sustentada até 35 dias após a indução de EAE-RR. Além disso, houve um aumento dos níveis de dois agonistas do receptor TRPA1 (H_2O_2 e 4-HNE) em amostras de medula espinal e gânglio trigeminal dos animais induzidos a EAE-RR. Sabendo que das alterações desses parâmetros de estresse oxidativo, os animais induzidos a EAE-RR foram tratados com dois antioxidantes, ácido alfa-lipoico e apocinina, e estes fármacos causaram redução da nocicepção presentes desenvolvidos após a indução do modelo de EMRR.

A fim de complementar os resultados descritos acima, foi avaliado o envolvimento do TRPA1 nos comportamentos nociceptivos, na evolução dos sinais clínicos e nos marcadores neuroinflamatórios após a indução de EAE-RR e EAE-EMP em camundongos selvagens e nocautes para os canais TRPA1. Através da indução de EAE-RR e EAE-EMP em animais nocautes para os canais TRPA1 foi observada a prevenção do desenvolvimento de comportamentos nociceptivos. Além disso, o aumento de dois marcadores neuroinflamatórios (Iba-1 e GFAP) em tecidos da medula espinal em animais induzidos aos modelos de EAE se contrapôs ao que foi observado em camundongos induzidos e nocautes para TRPA1, os quais se mantiveram semelhantes aos grupos controles. No entanto, a deleção gênica do TRPA1 não foi capaz de impedir o desenvolvimento de escores clínicos após a indução da EAE-RR e EAE-EMP. Curiosamente a deleção gênica foi capaz de atenuar o processo de desmielinização em ambos os modelos quando avaliados esses parâmetros pela coloração Fast Blue e o marcador de mielina OLIG-2. Por fim, ao utilizar essa abordagem genética através da deleção total do TRPA1, esses achados sugerem um papel essencial do TRPA1 nos sintomas neuropáticos semelhantes à dor e na neuroinflamação em ambos os modelos de EAE.

A fisiopatologia da EM consiste em neuroinflamação e desmielinização, culminando em perda axonal que pode aumentar a probabilidade de se desenvolver alterações sensoriais e aparecimento dos sintomas de dor (BÖLCSKEI et al., 2018; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; WANG et al., 2017). Existem diferentes tipos de modelos animais na área de pesquisa da EM, sendo a EAE o modelo mais amplamente utilizado (BJELOBABA et al., 2018). Porém existem modelos com induções e focos de estudo diferente, como no caso dos modelos induzidos por toxinas usando brometo de etídio e lisolecitina, ou toxinas administradas sistemicamente, como a cuprizona (BJELOBABA et al., 2018). Esses modelos seguem a hipótese de que pode haver fatores ambientais, como infecções virais, que levam ao desenvolvimento dessa patologia sendo a primeira escolha quando o objetivo principal é investigar um processo desmielinizante sem foco nas alterações no sistema imune (BJELOBABA et al., 2018; WOODRUFF; FRANKLIN, 1999). No entanto, o modelo de EAE consegue reproduzir características histopatológicas e imunológicas muito semelhantes as quais ocorrem na EM podendo mimetizar as diferentes formas e fases da doença (MIRABELLI; ELKABES, 2021). Na indução da EAE podem ser utilizados diferentes antígenos como a proteína proteolipídica da

mielina (PLP) e a glicoproteína de oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅). A MOG₃₅₋₅₅ é um antígeno de mielina que juntamente com o adjuvante inicia o processo de neuroinflamação e desmielinização tendo como alvo o ataque aos oligodendrócitos (BJELOBABA et al., 2018).

Cerca de 85% dos pacientes com EM apresentam a forma EMRR o que torna o desenvolvimento de modelos animais de EMRR de grande relevância a fim de elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da EM (HEIDARI et al., 2019). O modelo de EAE utilizando o antígeno PLP é um modelo de EMRR, porém é necessário o uso de camundongos adultos da linhagem SJL, pois são mais suscetíveis ao desenvolvimento de lesões desmielinizantes com esse antígeno. Outra desvantagem é a ausência de desmielinização na entrada do corno raiz dorsal, que é uma área de grande importância para sinalização da dor (CHALK et al., 1994; RASMUSSEN et al., 2007). Usando MOG₃₅₋₅₅ como antígeno e o CFA, é possível reproduzir um modelo progressivo de MS; entretanto, os animais apresentam comprometimento motor severo, e este fato pode prejudicar as medidas de nocicepção (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014; OLECHOWSKI et al., 2013). Portanto, primeiramente escolheu-se o modelo otimizado de EMRR em camundongos fêmeas C57BL/6 usando Quil A como adjuvante (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014).

O modelo de EMRR utilizando a saponina Quil A como adjuvante apresenta como principal característica o desenvolvimento do escore clínico da doença sem déficits motores graves. Corroborando com resultados anteriores, aqui pode-se observar a presença de sinais clínicos que mimetizam a EMRR, onde os escores variaram entre 0,5 (fase de remissão) e 1,5 (fase recorrente), com o primeiro pico da fase recorrente 14 dias após a indução (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014; PEIRIS et al., 2007). Após 14 dias da indução, os animais EAE-RR apresentaram média de escore 1,25 e no dia 21 após a indução foi de 0,7, portanto, conforme já descrito, os animais têm pontuações que variam acima de 0 ou inferior a 1,5 mostrando a característica recorrente-remitente deste modelo. Além disso, durante todos os experimentos, os animais não apresentaram perda significativa de peso corporal ou alterações locomotoras. Antes do presente estudo, existiam apenas três artigos científicos publicados relacionando este modelo de EMRR e o desenvolvimento de comportamento tipo dor neuropática (KHAN et al., 2015, 2018; KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). Sendo assim, avaliou-se o desenvolvimento de alterações locomotoras, de escores clínicos de EMRR, alodinia mecânica e ao frio usando este

modelo de RR-EAE. No estudo prévio utilizado como referência para este estudo, foi realizada a análise da marcha (teste de alteração locomotora) através do software Catwalk™XT (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). No entanto neste estudo, investigou-se a atividade locomotora espontânea ou forçada com o teste de campo aberto e teste de desempenho no cilindro giratório, respectivamente, sendo também observada a ausência de comprometimento locomotor.

Além das alterações locomotoras, os sintomas de dor aparecem nas fases iniciais da EMRR, causando diversas limitações e diminuição da qualidade de vida desses pacientes (GALEA; WARD-ABEL; HEESSEN, 2015; MOTL; SUH; WEIKERT, 2010; TRUINI et al., 2012). Previamente, o modelo de EAE-RR havia sido otimizado como um modelo de dor neuropática central na EMRR, porém apenas a alodinia mecânica na região da pata traseira havia sido avaliada em relação ao desenvolvimento de nocicepção (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). No entanto, os pacientes com EM também relatam a manifestação de alodinia ao frio (ÖSTERBERG; BOIVIE, 2010). No presente estudo, confirmou-se o desenvolvimento de alodinia mecânica (teste de von Frey) e demonstrou-se o desenvolvimento de alodinia ao frio (teste de acetona) nos dias 21 a 35 após a indução de RR-EAE, já demonstrada em outros modelos de dor neuropática (ANTONIAZZI et al., 2019; TREVISAN et al., 2013a). Após a confirmação do desenvolvimento de alodinia, foi selecionado o 35º dia após a indução como dia do pico de nocicepção no modelo RR-EAE, dia o qual seriam realizadas as avaliações de curvas de nocicepção de todos os compostos aqui testados. A pregabalina foi o fármaco escolhido como controle positivo, pois é um anticonvulsivante que apresenta o análogo estrutural da gabapentina sendo considerado um medicamento de primeira linha no tratamento da dor neuropática na EM (THOMPSON et al., 2018b). Após o tratamento e avaliação de curva tempo-resposta, observou-se o efeito antinociceptivo da pregabalina para a alodinia mecânica e ao frio. O efeito antinociceptivo da gabapentina no modelo de RR-EAE usado neste estudo já havia sido descrito (DANESHDOUST et al., 2017). No entanto, drogas análogas do ácido gama-aminobutírico (GABA), como gabapentina e pregabalina, não são muito eficazes no tratamento da dor neuropática na EM e comumente causam efeitos adversos intoleráveis (SOLARO et al., 2005; SOLARO; MESSMER UCCELLI, 2011). Portanto, é essencial a busca de novos mecanismos para o tratamento da dor neuropática na EM.

No modelo de EAE-RR ainda não havia medidas de nocicepção relacionadas aos sintomas do tipo enxaqueca. Em vista disso, este estudo demonstrou pela primeira vez o desenvolvimento de alodinia mecânica periorbital após a indução do modelo de EAE-RR. O desenvolvimento de alodinia na região periorbital e outras áreas cutâneas é considerado uma característica de enxaqueca (EDELMAYER et al., 2012; HARGREAVES; OLESEN, 2019). Utilizando o modelo de EAE progressiva previamente foram já haviam sido descritos o desenvolvimento de nocicepção periorbital após indução (DUFFY et al., 2019). Assim como na primeira etapa de avaliação dos sintomas do tipo dor neuropática, dois compostos extensamente utilizados para o tratamento da enxaqueca, a sumatriptana e o olcegepant, foram testados como controles positivos para as avaliações de seus efeitos na alodinia mecânica periorbital. Assim como nas avaliações dos sintomas tipo dor neuropática, também se verificou que o pico de nocicepção para o desenvolvimento de alodinia mecânica periorbital se desenvolveu no 35º dia após indução, e, portanto, as curvas tempo-resposta dos tratamentos foram avaliadas neste dia. A sumatriptana é um agonista dos receptores de serotonina (5HT)_{1B/D} e seu mecanismo de ação se dá através da vasoconstrição dos vasos da região craniana e da dura-máter apresentando alta efetividade no alívio das crises de enxaqueca (BECKER, 2015; SAMRA; RAMTAHAL, 2012; THORLUND et al., 2017). Além disso, a sumatriptana é um fármaco extensamente utilizado como controle positivo em modelos de enxaqueca em roedores, a fim de otimizar a pesquisa de possíveis mecanismos na fisiopatologia desse sintoma (EDELMAYER et al., 2009, 2012). A administração de sumatriptana apresentou efeito antinociceptivo em diferentes modelos de enxaqueca, como a aplicação de um ativador de receptor de protease tipo 2 (proalgésico) nas meninges em camundongos e a administração por cânula na dura-máter de mediadores inflamatórios em ratos (EDELMAYER et al., 2009; HASSLER et al., 2019). Aqui observou-se após a indução da EAE-RR um efeito antialodínico semelhante deste fármaco. Porém, as triptanas, classe à qual pertence a sumatriptana, geram diversos tipos de efeitos adversos nos pacientes como alterações cardiovasculares e no sistema nervoso central (COLÁS CHACARTEGUI et al., 2005; ROBERTO et al., 2015). Ademais, o uso frequente de triptanas tem sido relatado como um agravante das crises de enxaqueca levando a sua cronicidade (SAENGJAROENTHAM et al., 2020).

Os antagonistas dos receptores ou bloqueadores de CGRP surgiram como uma nova classe para o tratamento dos sintomas agudos de enxaqueca (BORKUM, 2019). Além disso, o CGRP e seus receptores estão expressos no sistema nervoso central estando intrinsecamente ligados as respostas nociceptivas (BORKUM, 2019; EDVINSSON et al., 2018; HARGREAVES; OLESEN, 2019). O olcegepant, um agonista dos receptores de CGRP, embora descontinuado na clínica, continua sendo utilizado como controle positivo e na padronização de diferentes modelos de enxaqueca (DE LOGU et al., 2019b; MARONE et al., 2018; TANG et al., 2020). O olcegepant apresentou efeito antinociceptivo para alodinia mecânica periorbital através da administração sistêmica de nitroglicerina ou injeção subcutânea na área periorbital de CGRP (DE LOGU et al., 2019b; MARONE et al., 2018). De acordo com os resultados prévios, observou-se que o olcegepant também apresentou efeito antinociceptivo na avaliação da alodinia periorbital mecânica no modelo EAE-RR no 35º dia após indução. Desta forma, o conjunto de resultados aqui descritos pode ser considerado como modelo otimizado e inédito de alodinia mecânica periorbital associada ao modelo EAE-RR. Porém, sabe-se das limitações que apenas uma medida de nocicepção evocada tanto para a alodinia mecânica e ao frio na região da pata quanto alodinia mecânica na região periorbital. Portanto, sugere-se que em futuros estudos, utilizando o modelo EAE-RR, possam ser avaliados alguns parâmetros de nocicepção espontânea como, por exemplo, teste de verificação de expressão facial (grimacing scale), avaliação de construção do ninho (nest building behavior) ou avaliação de vocalização ultrassônica (analysis ultrasonic vocalization).

Tendo em vista a busca por novas terapias para a dor na EM, os receptores TRPA1 surgem como alvos terapêuticos potenciais, já que são descritos como canais envolvidos na nocicepção em diferentes modelos experimentais de dor (ANTONIAZZI et al., 2019; DE ALMEIDA et al., 2020; DE LOGU et al., 2020a; FERNANDES et al., 2011; TREVISAN et al., 2013a). No entanto, até o presente estudo, o papel do TRPA1 na neuroinflamação e nocicepção no modelo de EAE-RR e EAE-EMP ainda não havia sido investigado. Publicações anteriores, utilizando o modelo de desmielinização por cuprizona, observaram uma atenuação do processo desmielinizante em animais com deleção de TRPA1 (BÖLCSKEI et al., 2018; KRISZTA et al., 2019; SÁGHY et al., 2016). Além disso, diferentes modelos de dor neuropática (DE LOGU et al., 2017; MATERAZZI et al., 2012; NASSINI et al., 2011; RIGO et al., 2013; TREVISAN et al., 2013c, 2016) mostraram o envolvimento dos canais TRPA1 no desenvolvimento de

alodinia mecânica e ao frio. Esse papel foi sugerido através do tratamento oral com antagonistas seletivos dos canais TRPA1 (HC-030031 e A-967079) em animais induzidos aos diferentes modelos de dor neuropática que demonstraram efeito antinociceptivo eficaz e transitório. Como ainda não havia investigações sobre o envolvimento dos canais TRPA1 no modelo RR-EAE, testou-se os antagonistas seletivos, HC-030031 e A-967079, e ambos demonstraram efeitos antinociceptivos após administração oral na avaliação mecânica e pelo frio, corroborando com os estudos prévios descritos acima. Sabendo da expressão de canais TRPA1 em neurônios sensoriais do corno da raiz dorsal da medula espinal (DAI, 2016), logo testou-se os efeitos do HC-030031 e A-967079 pela via intratecal, que também se mostrou o efeito antialodínico após administração.

Além de modelos animais de dor neuropática, o papel dos canais TRPA1 em comportamentos do tipo enxaqueca e dor trigeminal também têm sido amplamente investigados (JIANG et al., 2019; NASSINI et al., 2012; TREVISAN et al., 2016). Em um modelo de dor neuropática trigeminal através da constrição do nervo infraorbital foram observados os efeitos antinociceptivos do HC-030031 e do A-967079 (TREVISAN et al., 2016). Através da administração de potássio no córtex cerebral de camundongos o tratamento com A-967079 foi capaz de diminuir a depressão alastrante cortical, uma alteração sináptica envolvida no desenvolvimento da enxaqueca com aura (JIANG et al., 2019). O tratamento com HC-030031 demonstrou efeito antialodínico após a aplicação direta na dura-máter de óleo de mostarda e umbelulona (agonistas de TRPA1) que levam ao desenvolvimento de alodinia mecânica facial (EDELMAYER et al., 2012; NASSINI et al., 2012). Além disso, no modelo tipo enxaqueca induzido pela administração sistêmica de gliceril trinitrato, o pré-tratamento intraperitoneal com HC-030031 atenuou o desenvolvimento de alodinia mecânica periorbital (MARONE et al., 2018). De acordo com os dados anteriormente citados, neste estudo pode se observar também um efeito antialodínico de ambos os antagonistas seletivos de TRPA1, HC-030031 e A-967079, em camundongos induzidos por RR-EAE.

Para além da abordagem farmacológica com HC-030031 e A967079, recentemente os analgésicos metamizol (dipirona) e propifenazona foram descritos como antagonistas não seletivos dos canais TRPA1 (NASSINI et al., 2015). Ambos os fármacos são considerados anti-inflamatórios não esteroides atípicos devido aos seus efeitos analgésicos que se dissociam de suas ação anti-inflamatória (BURDAN, 2004;

DE SOUZA CARVALHO et al., 2012; HEARN; DERRY; MOORE, 2016). Sabendo que o metamizol é um dos analgésicos mais comuns usados para tratamento da cefaleias primárias (RAMACCIOTTI; SOARES; ATALLAH, 2007), foram analisados os efeitos anti-hiperalgésicos do metamizol e propifenazona nos animais induzidos a EAE-RR. Para além da abordagem farmacológica com HC-030031 e A967079, vimos que tanto o tratamento com metamizol quanto com propifenazona foram capazes de reduzir a alodinia mecânica periorbital causada pelo modelo de EAE-RR. Embora não publicados os dados, observou-se o mesmo efeito antinociceptivo de ambos os analgésicos para as medidas de alodinia mecânica e ao frio na região da pata. Sabe-se que o metamizol possui outros mecanismos de ação através da inibição das enzimas ciclooxigenase, estimulação de receptores endocanabinoides, e pode atuar nos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos, sendo todos seus mecanismos ainda não totalmente elucidados. A propifenazona também possui como mecanismo de ação a inibição das enzimas ciclooxigenase. Sugere-se, portanto, que além dos mecanismos já propostos, os efeitos analgésicos do metamizol e da propifenazona também atuam através do antagonismo dos canais TRPA1, (BLASER et al., 2021a, 2021b; GENCER; GUNDUZ; ULUGOL, 2015). Dessa maneira, esse conjunto de resultados inéditos sugere o envolvimento da ativação dos canais de TRPA1 nos sintomas do tipo enxaqueca e tipo dor neuropática no modelo experimental de EMRR.

Os canais TRPA1 são podem ser ativados por uma série moléculas endógenas geradas pelas respostas inflamatórias e estresse oxidativo (OGAWA; KUROKAWA; MORI, 2016; TREVISANI et al., 2007). Na EM o processo inflamatório crônico gera constantemente espécies reativas que acabam por sustentar o processo de desmielinização nos axônios (AARTS et al., 2003; HAIDER et al., 2011). Alguns desses subprodutos do estresse oxidativo, como H_2O_2 e 4-HNE são considerados agonistas/ativadores dos canais TRPA1 podendo estar associados a sinais de nocicepção em diferentes tipos de modelos de dor (ANTONIAZZI et al., 2019; DE LOGU et al., 2017; TREVISAN et al., 2016). Além dos subprodutos do estresse oxidativo, existem diferentes enzimas envolvidas na produção de espécies reativas. Dentre essas enzimas temos a NADPH oxidase que é uma enzima importante geração de espécies reativas de oxigênio e já foi descrita por contribuir no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas crônicas, como a EM (MA et al., 2017). No mesmo modelo de EAE-RR já foi descrito um aumento da atividade da NADPH oxidase em amostras de córtex e medula de camundongos induzidos (MA et

al., 2017). Neste contexto, um dos objetivos do estudo foi analisar os níveis desses dois agonistas do TRPA1 e da enzima NADPH oxidase primeiramente em amostras de medula espinal dos animais induzidos a EAE-RR. Logo após as análises desses parâmetros, observou-se o aumento dos níveis de H₂O₂ e 4-HNE, bem como o aumento da atividade da NADPH oxidase em amostras de medula espinal após 35 dias de indução da EAE-RR.

A primeira fase da alodinia mecânica periorbital é mantida pela produção de espécies reativas de oxigênio dependentes de TRPA1 e da NADPH oxidase nos neurônios do gânglio trigeminal (MARONE et al., 2018). A segunda fase é caracterizada pela geração de espécies reativas de carbonil, como o 4-HNE (MARONE et al., 2018). No modelo de depressão alastrante cortical foi demonstrado o papel de H₂O₂ na ativação do TRPA1, sendo essa ativação foi revertida pelo antagonista A-967079 em amostras de córtex de camundongos (JIANG et al., 2019). No modelo de constrição do nervo infraorbital observou-se um aumento dos níveis de H₂O₂ e 4-HNE e da atividade da superóxido dismutase através de infiltrados de monócitos e macrófagos no nervo infraorbital periférico lesionado (TREVISAN et al., 2016). Outro modelo de enxaqueca induzido por gliceril trinitrato demonstrou um aumento dos níveis de H₂O₂ e 4-HNE no gânglio trigeminal (MARONE et al., 2018). Desta maneira, a fim de avaliar o desenvolvimento de alodinia mecânica periorbital e a ativação dos canais TRPA1 foram analisados parâmetros de estresse oxidativo em amostras de gânglio trigeminal e tronco encefálico. Resultados semelhantes aos encontrados em amostras de medula espinal foram encontrados em amostras de gânglio trigeminal de camundongos induzidos EAE-RR. As atividades das enzimas NADPH e superóxido dismutase estavam aumentadas no gânglio trigeminal, bem como os agonistas dos canais TRPA1, H₂O₂ e 4-HNE, após 35 dias de indução.

Sabendo do aumento dos parâmetros de estresse oxidativo, incluindo os agonistas do TRPA1 no modelo RR-EAE, avaliou-se o efeito de dois antioxidantes, o ácido alfa-lipoico e a apocinina, na alodinia mecânica e ao frio na pata e na alodinia periorbital. Em estudos prévios, a apocinina (inibidor da NADPH oxidase), reduziu a alodinia mecânica em um modelo de lesão medular (HASSLER et al., 2019) e dor neuropática no diabetes (OLUKMAN et al., 2018) em ratos, e dor neuropática trigeminal em camundongos (TREVISAN et al., 2016). O ácido α -lipóico apresentou efeito antinociceptivo na alodinia mecânica em um modelo de dor no câncer e no mesmo modelo de EAE-RR (ANTONIAZZI et al., 2019; KHAN et al., 2015). No

presente estudo também se observou os efeitos antialodínico com a administração de ácido α -lipóico e apocinina por via oral nos testes de alodinia mecânica e ao frio. Também se avaliou o tratamento com ácido alfa-lipoico e apocinina por via intratecal e o efeito antialodínico de ambos os antioxidantes foram observados. Da mesma maneira, o tratamento por via oral com ácido alfa-lipoico e apocinina também foi capaz de atenuar a alodinia mecânica periorbital induzida pelo modelo EAE-RR. Todos esses resultados sugerem que um papel de espécies reativas no processo neuroinflamatório na EM que podem levar à ativação do canal TRPA1 e demonstrar as alterações sensoriais do tipo dor neuropática e enxaqueca. Infelizmente, ainda não existem muitos estudos que mostrem um estudo randomizado sobre pacientes com EM e essas alterações sensoriais. Por fim, esses compostos podem atuar nas vias central e periférica, como mostrado em diferentes formas de administração e de acordo com outros estudos (DE LOGU et al., 2017; NASSINI et al., 2014; TREVISAN et al., 2016).

Além dos tratamentos com antagonistas do TRPA1, usou-se duas abordagens de deleção genética dos canais TRPA1 para avaliar comportamentos de nocicepção em diferentes modelos de dor (ANTONIAZZI et al., 2019; DE LOGU et al., 2017). A primeira abordagem foi através da administração intratecal do oligonucleotídeo antissentido (AS ODN) para o TRPA1 através da inibição temporária da síntese desses receptores. Aqui, de acordo com estudos anteriores, demonstrou-se que o tratamento com oligonucleotídeo antissentido do TRPA1 atenuou a alodinia mecânica e ao frio na região da pata dos camundongos induzidos por RR-EAE. Ademais, não se observou alteração na expressão gênica dos canais TRPA1 em amostras de medula espinal, gânglio trigeminal e tronco encefálico dos animais induzidos ao modelo EAE-RR, somente se observou um aumento dessa expressão na medula espinal de animais induzidos ao modelo EAE-EMP (RITTER et al., 2020). Sabe-se que na indução de EAE-EMP se mimetiza a forma mais agressiva da doença, sendo assim os animais apresentam uma evolução dos escores clínicos e debilitantes mais rapidamente, a partir do 13º após a indução (OLECHOWSKI et al., 2013; OLECHOWSKI; TRUONG; KERR, 2009; RITTER et al., 2020). Portanto, o processo de inflamação e desmielinização é mais acentuado no modelo EAE-EMP, o que pode justificar essa diferença entre as expressões dos canais TRPA1 na medula espinal. Porém, são necessárias mais investigações a nível molecular para elucidar essas diferenças.

Na segunda abordagem utilizou-se a ferramenta genética para deleção total para os canais TRPA1 em camundongo da mesma linhagem utilizada nos experimentos anteriores. Nesta etapa dos experimentos, todos os parâmetros foram analisados em dois modelos de EM (EAE-RR e EAE-EMP). Como brevemente descrito no início, o modelo de EAE-EMP se diferencia da EAE-RR pela aplicação do adjuvante ACF. Esse modelo de EAE é o mais utilizado para mimetizar a forma progressiva da doença (OLECHOWSKI et al., 2013; OLECHOWSKI; TRUONG; KERR, 2009), sendo publicado dois artigos do nosso grupo de pesquisa utilizando este modelo, o primeiro avaliando o desenvolvimento de comportamentos do tipo dor neuropática (RITTER et al., 2020) e o segundo o desenvolvimento de alodinia mecânica periorbital (DALENOGARE et al., 2021) e a relação com a ativação dos receptores TRPA1. No modelo de EAE-EMP já otimizado, as avaliações de nocicepção foram todas realizadas no 14^o dia após indução, bem como a retirada de amostras para imunistoquímica, pois este dia foi designado como o pico de nocicepção e também de escore clínico (DALENOGARE et al., 2021; RITTER et al., 2020).

Diferentes modelos de camundongos de dor neuropática demonstraram que a deleção de canais TRPA1 poderia reduzir a alodinia mecânica na pata e na área periorbital (DE LOGU et al., 2017, 2019a, 2020a; MATERAZZI et al., 2012; TREVISAN et al., 2016). Na indução de neuropatia alcoólica e a ligação parcial do nervo ciático, a deleção total de canais TRPA1 ou seu silenciamento específico nas células de Schwann preveniu o desenvolvimento de alodinia mecânica e ao frio (DE LOGU et al., 2017, 2019a). Os camundongos nocautes para receptores TRPA1 não desenvolveram alodinia mecânica e ao frio no modelo de neuropatia periférica induzida por paclitaxel (MATERAZZI et al., 2012) e na síndrome de dor regional complexa (DE LOGU et al., 2020a). Em diferentes modelos de enxaqueca como pela administração de gliceril trinitrato de (MARONE et al., 2018), injeção de umbelulona (NASSINI et al., 2012) e constrição do nervo infraorbital (TREVISAN et al., 2016) mostraram uma diminuição da nocicepção na região periorbital em camundongos nocautes para os canais TRPA1. De acordo com os estudos anteriores citados, a deleção total dos receptores TRPA1 também foi capaz de prevenir o desenvolvimento de alodinia ao frio e mecânica na região da pata, e na alodinia mecânica periorbital após as induções de EAE-RR e EAE-EMP. Esses resultados corroboram nossos resultados anteriores

usando o bloqueio farmacológico dos canais TRPA1 em ambos os modelos de EM (DALENOGARE et al., 2020; RITTER et al., 2020).

Após avaliação do papel dos receptores TRPA1 no desenvolvimento de nocicepção nos dois modelos de EM, foram analisados também alguns parâmetros inflamatórios a nível de medula espinal. Neste contexto, o marcador GFAP tem uma alta especificidade para danos em astrócitos sendo biomarcador importante durante a inflamação aguda em pacientes com EMRR (KASSUBEK et al., 2017). O Iba-1 é uma proteína cuja expressão é restrita à microglia/macrófagos sendo utilizado como um marcador de ativação da microglial (OHSAWA et al., 2004). Um aumento de GFAP e Iba-1 foi observado em amostras de medula espinal de camundongos induzidos por RR-EAE por análises imunistoquímicas (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014), e primeiramente mostrou-se um aumento dos níveis de expressão de RNA em ambos os marcadores por RT-PCR. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e tem sido associada à fisiopatologia da EM. Também pode estar envolvido no processo de desmielinização em modelos de EAE (MADSEN et al., 2016). Encontrou-se um aumento dos níveis de expressão de RNA de TNF- α , confirmando assim a presença de processo neuroinflamatório neste modelo. Nos estudos anteriores, foram mostrados todos os aspectos histológicos e imunológicos deste modelo e otimizado a melhor dose dos reagentes utilizados para a indução (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014).

Os receptores TRPA1 estão expressos no SNC em astrócitos (LEE et al., 2012; SÁGHY et al., 2016; SHIGETOMI et al., 2011), oligodendrócitos (HAMILTON et al., 2016) e macrófagos (NAERT; LÓPEZ-REQUENA; TALAVERA, 2021). A ativação de astrócitos, microglia e oligodendrócitos emergiu como um papel principal à dor crônica (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013). Vários estudos em diferentes modelos experimentais de dor mostraram aumento de marcadores inflamatórios e alterações morfológicas, incluindo proliferação e hipertrofia celular, de marcadores gliais como Iba-1 e GFAP (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013). Assim, três estudos observaram uma regulação positiva dos marcadores Iba-1 através da indução de EAE (BURNS et al., 2014; CHINNASAMY et al., 2015; KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). Conforme os resultados já descritos, a presença de microglia/macrófagos positivos para Iba-1 indicaram um papel essencial dessas células no processo neuroinflamatório na região do corpo caloso de camundongos induzidos a EAE-EMP (BURNS et al., 2014). No mesmo protocolo de indução da EAE-RR, também foi demonstrado aumento do Iba-

1 no corpo caloso e medula espinal (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). Outras evidências estabeleceram uma relação entre a ativação do TRPA1, o marcador Iba-1 e o comportamento de nocicepção (MEOTTI et al., 2017). Em um estudo anterior, a deleção dos canais TRPA1 atenuou a ativação da micróglia através do marcador Iba-1 após o modelo de hiperalgesia induzida pelo agonista do receptor B1 da bradicinina (MEOTTI et al., 2017). Além disso, alguns modelos de neuropatia, como lesão por constrição crônica do nervo ciático (KWIATKOWSKI et al., 2020; ROJEWSKA et al., 2016) e neuropatia periférica induzida por quimioterápico (MAKKER et al., 2017) demonstraram o desenvolvimento de alodinia mecânica em camundongos induzidos e o aumento do marcador Iba-1 no córtex e medula espinal. Aqui, verificou-se que a deleção dos canais TRPA1 impediu o aumento das células Iba-1-positivas causadas pela indução de EAE-RR e EAE-EMP na medula espinal.

Os astrócitos medeiam diversas funções no sistema nervoso central, e algumas evidências mostraram seu envolvimento em doenças neurodegenerativas, como a EM (LINNERBAUER; WHEELER; QUINTANA, 2020; YI; SCHLÜTER; WANG, 2019). Outros achados mostraram a importância dos astrócitos na EM, o que pode influenciar nos fenótipos clínicos, patogênese, progressão e recuperação desta patologia (YI; SCHLÜTER; WANG, 2019). Os canais TRPA1 também são expressos em astrócitos, e um estudo recente desempenha uma contribuição para a formação de toxicidade precoce de oligômeros A β pela hiperatividade de Ca²⁺ nos canais TRPA1, o que leva a um estado de hiperatividade neuronal (BOSSON et al., 2017). Através de um modelo experimental da doença de Alzheimer, foi visto que existe uma relação entre a ativação dos canais TRPA1, o processo neuroinflamatório e a ativação astrogliar através do aumento de GFAP, um conhecido marcador de astrócitos (LEE et al., 2016). Além disso, alguns resultados após indução de EAE mostraram uma regulação positiva de GFAP (DOOLEN et al., 2018; KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). A ativação celular marcada pelo GFAP também foi relacionada a comportamentos de nocicepção em um modelo de dor neuropática por lesão da medula espinal (GUO et al., 2012; VIEIRA et al., 2021; WANG et al., 2013). Aqui, a deleção de TRPA1 preveniu o aumento de células GFAP-positivas após indução de ambos os modelos EAE-RR e EAE-EMP.

A MOG é um componente de mielina expresso no SNC responsável pelo processo de mielinização e maturação de oligodendrócitos (PESCHL et al., 2017). A diminuição deste marcador em um modelo RR-EAE foi previamente demonstrada da

análise de imunistoquímica (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014). O OLIG-1 é um fator de transcrição envolvido na formação e reparo da mielina, que é reduzido em modelos de lesão da medula espinal (OTHMAN et al., 2011). Nossos resultados concordam com esses estudos, demonstrando redução níveis de RNA tanto de MOG quanto de Olig-1 por ensaio de RT-qPCR e sugerindo um processo desmielinizante em um modelo RR-EAE (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014; OTHMAN et al., 2011). Assim, mostrou-se um possível processo desmielinizante e neuroinflamatório por meio de RT-PCR, o que concorda com este modelo otimizado anterior de dor neuropática por indução de RR-EAE (KHAN; WOODRUFF; SMITH, 2014).

O processo de desmielinização e lesão de oligodendrócitos na EM resulta em comprometimento da propagação do impulso neuronal e, conseqüentemente, vários déficits funcionais (GRUCHOT et al., 2019). Conforme descrito anteriormente, os modelos de EAE poderiam induzir o processo desmielinizante, que manifesta deficiências motoras mimetizando as manifestações clínicas da EM (BJELOBABA et al., 2018; CONSTANTINESCU et al., 2011). Aqui, observou-se a presença de escores clínicos após camundongos induzidos por PMS ou RR-EAE; no entanto, a deleção dos canais TRPA1 não impediu o desenvolvimento desses sinais clínicos. Resultados semelhantes foram observados usando um modelo de EAE, onde o bloqueio dos receptores toll-like 2 e 4 não conseguiu reduzir as deficiências motoras, mas reverteu a alodinia causada pela indução de EAE (KWILASZ et al., 2021). Através da coloração Fastblue confirmou-se a desmielinização nos animais induzidos em ambos os modelos de EAE, e os animais nocaute se mantiveram semelhantes aos controles não induzidos. Outro marcador avaliado nos dois modelos foi o OLIG-2, que é altamente expresso em neurônios motores e oligodendrócitos sendo responsável à diferenciação e maturação de células progenitoras de oligodendrócitos (OTHMAN et al., 2011). Este fator de transcrição regula a regeneração da mielina durante a desmielinização crônica e é um importante marcador para investigar os possíveis novos alvos para restaurar a desmielinização (OTHMAN et al., 2011). Assim, anteriormente, usando um modelo de cuprizona, observou-se que a desmielinização teve uma redução significativa do número de células marcadas por OLIG-2 (SAFAEI; EFTEKHARI; ALIOMRANI, 2021). Aqui, o fator de transcrição de oligodendrócitos, OLIG-2, apresentou uma redução significativa em camundongos induzidos por EAE-RR e EAE-EMP, sendo que as análises nos tecidos de animais nocautes para os canais TRPA1 se aproximou dos animais controles não induzidos. Assim, estes resultados

sugerem que a deleção dos canais TRPA1 pode ajudar no processo de remielinização, mas é insuficiente para recuperar os escores clínicos de ambas as induções.

6 CONCLUSÃO

Diferentes tipos de células e de proteínas estão envolvidos nos processos inflamatórios, degenerativos e no desenvolvimento de sintomas de dor, sendo os canais TRPA1 uma importante proteína-alvo de investigação. No presente estudo, primeiramente, demonstrou-se o papel da proteína TRPA1 nos sintomas do tipo dor neuropática através de avaliação da alodinia mecânica e ao frio na pata traseira de animais induzidos a EAE-RR. O desenvolvimento de sintomas do tipo dor neuropática foram validados usando o fármaco pregabalina, o qual apresentou atividade antinociceptiva em ambos os testes de nocicepção. Em sequência, como resultados inéditos, padronizou-se um modelo de enxaqueca através da indução de EAE-RR a observação do efeito anti-alodínico dos medicamentos usados para o tratamento da enxaqueca, sumatriptana e olcegepant.

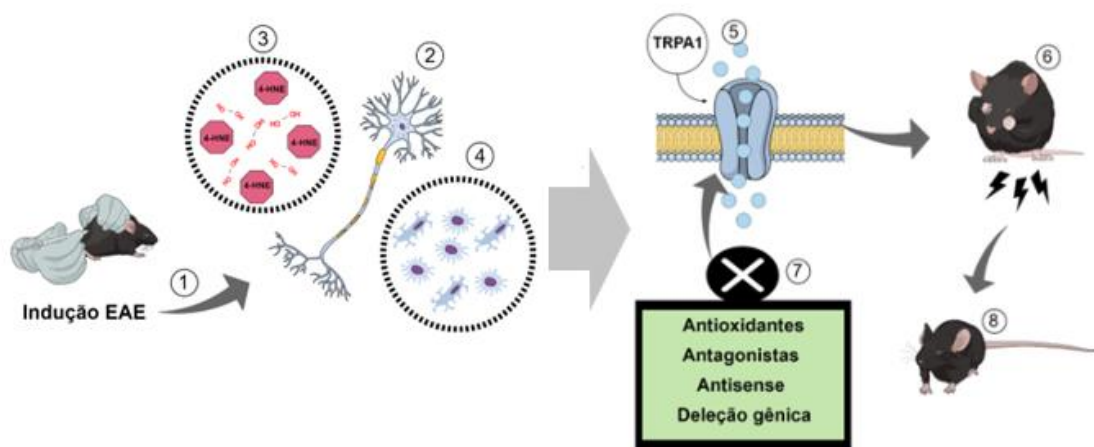
A fim de investigar o papel dos canais TRPA1, observou-se que bloqueio farmacológico desses canais foi capaz de atenuar a alodinia mecânica e ao frio na região da pata traseira, e na alodinia mecânica periorbital causada pela indução de EAE-RR. O tratamento com o oligonucleotídeo antissentido para o TRPA1 foi capaz de diminuir a alodinia mecânica e ao frio na pata traseira no modelo EAE-RR, e não houve alteração na expressão de RNA dos canais TRPA1 após indução.

Sabendo que os canais TRPA1 podem ser ativados por subprodutos do estresse oxidativo, observamos um aumento dos agonistas endógenos do TRPA1 (H_2O_2 e 4-HNE) em amostras medula espinal e gânglio trigeminal de animais induzidos a EAE-RR. A atividade da enzima NADPH oxidase também estava aumentada tanto em amostras de medula espinal e gânglio trigeminal. Porém a atividade da SOD estava aumentada somente em amostras de gânglio trigeminal. A partir do aumento dos parâmetros de estresse oxidativo, demonstrou-se o efeito antinociceptivo dos antioxidantes ácido alfa-lipoico e apocinina. Esses resultados sugerem, uma possível diminuição transitória das espécies reativas e atenuação da alodinia no modelo EAE-RR com o tratamento agudo com esses antioxidantes.

Por fim, através da deleção gênica total dos receptores TRPA1 observou-se um papel importante desses canais no desenvolvimento dos sintomas do tipo dor neuropática causados pela indução de EAE-RR e EAE-EMP. Além disso, as evidências demonstraram que a ausência de expressão dos canais TRPA1 é capaz de prevenir o aumento dos marcadores de neuroinflamação Iba-1 e GFAP no após a

indução de ambos os modelos. Dessa forma, o conjunto de resultados aqui descritos sugerem um possível papel do TRPA1 no processo inflamatório e atenuação de comportamentos neuropáticos semelhantes à dor em dois diferentes modelos de esclerose múltipla. Portanto, os resultados aqui descritos sugerem que o canal TRPA1 é um alvo valioso para futuras investigações para tratar a dor neuropática e sintomas de enxaqueca em pacientes com esclerose múltipla (Figura 4).

Figura 4 - Resumo Ilustrativo da Conclusão



Legenda Figura 4: 1 - Indução dos modelos de EAE-RR e EAE-EMP; 2 – Processo de desmielinização e escores característicos da EMP e EMRR; 3 - Aumento dos parâmetros de estresse oxidativo, incluindo os agonistas do TRPA1 4-HNE e H₂O₂ no modelo EAE-RR; 4 - Aumento dos marcadores de neuroinflamação Iba1 (macrófagos/micróglia) e GFAP (astrócitos); 5 - Sugere-se que há uma ativação dos canais TRPA1 pelo processo de inflamatório e de estresse oxidativo causado pela indução de ambos os modelos; 6 – Desenvolvimento de alodinia mecânica e ao frio na região da pata nos modelos EAE-RR e EAE-EMP, e de alodinia mecânica periorbital no modelo RR-EAE; 7 e 8 – Todos os tratamentos se mostraram eficazes em atenuar com comportamentos de nocicepção nos dois modelos de EAE.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste estudo podem ser considerados as primeiras investigações relacionando os canais TRPA1 e o modelo de EAE-RR e EAE-EMP. Mesmo assim, ainda é necessário a elucidação por completo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos sintomas do tipo dor em ambos os modelos de EM e a ativação dos canais TRPA1.

Para melhor elucidação dos mecanismos de ativação do TRPA1 nos modelos de EAE-RR e EAE-EMP podem ser mais bem avaliados outros parâmetros de estresse oxidativo e alguns marcadores de neuroinflamação, além de Iba-1 e GFAP. O marcador de 4-HNE, agonista dos canais TRPA1, pode ser futuramente analisado por imunofluorescência em amostras medula espinal e gânglio trigeminal de animais induzidos a EAE-RR e EAE-EMP. Os marcadores Iba-1 e GFAP também poderiam ser analisados em animais nocautes para os canais TRPA1 e induzidos a EAE-RR e EAE-EMP em outras estruturas relacionadas a dor como, por exemplo, o gânglio trigeminal. Além disso, seria de grande importância avaliar os níveis de CGRP em amostras de gânglio trigeminal, já que houve efeito antialodínico do antagonista CGRP, olcegepant.

Aqui foi possível elucidar a razão de os escores clínicos se manterem os mesmos em camundongos nocautes para os canais TRPA1, mas apresentarem diminuição dos comportamentos de nocicepção. Desta maneira, é necessário investigar se essas diferenças seriam devido aos modelos de indução através da avaliação de marcadores de mielina e de inflamação em tecidos como a medula espinal.

Desta forma, de acordo com as evidências encontradas até o momento podemos sugerir uma relação entre a ativação do TRPA1 e o desenvolvimento de comportamentos de nocicepção em um modelo de dor neuropática e de dor de cabeça induzidos por EMRR e EMP.

REFERÊNCIAS

AARTS, M. et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 863–77, 26 dez. 2003.

AKOPIAN, A. N. Regulation of Nociceptive Transmission at the Periphery Via TRPA1-TRPV1 Interactions. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 89–94, 21 dez. 2010.

ANDERSSON, D. A. et al. Transient Receptor Potential A1 Is a Sensory Receptor for Multiple Products of Oxidative Stress. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2485–2494, 5 mar. 2008.

ANTONIAZZI, C. T. D. D. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 2, p. 355–365, 15 jan. 2019.

APKARIAN, A. V. **Definitions of nociception, pain, and chronic pain with implications regarding science and society** *Neuroscience Letters* Neurosci Lett, , 29 maio 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30503918/>>. Acesso em: 14 abr. 2022

ARAYA, I. et al. Contribution of intraganglionic CGRP to migraine-like responses in male and female rats. **Cephalalgia: an international journal of headache**, v. 40, n. 7, p. 689–700, 1 jun. 2020.

ASHINA, M. et al. Human models of migraine - short-term pain for long-term gain. **Nature reviews. Neurology**, v. 13, n. 12, p. 713–724, 1 dez. 2017.

BACKONJA, M. et al. NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind study. **The Lancet. Neurology**, v. 7, n. 12, p. 1106–12, dez. 2008.

BALDASSARI, L. E.; FOX, R. J. **Therapeutic Advances and Challenges in the Treatment of Progressive Multiple Sclerosis** *Drugs* Springer, , 25 set. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-018-0984-5>>. Acesso em: 14 abr. 2022

BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. **Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection** *Neuron*, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26247858/>>. Acesso em: 14 abr. 2022

BANDELL, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, n. 6, p. 849–857, 25 mar. 2004.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain Introduction: Acute Versus Persistent Pain. p. 1–22, 2009.

BASSO, L.; ALTIER, C. **Transient Receptor Potential Channels in neuropathic pain***Current Opinion in Pharmacology* Curr Opin Pharmacol, , 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27835802/>>. Acesso em: 17 abr. 2022

BAUTISTA, D. M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, v. 124, n. 6, p. 1269–82, 24 mar. 2006.

BECKER, W. J. **Acute migraine treatment in adults***Headache* Blackwell Publishing Inc., , 1 jun. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/head.12550>>. Acesso em: 24 abr. 2020

BECKMANN, Y.; TÜRE, S. Headache characteristics in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 27, n. September 2018, p. 112–116, 2019.

BEISKE, A. G. et al. Pain and sensory complaints in multiple sclerosis. **European Journal of Neurology**, v. 11, n. 7, p. 479–482, jul. 2004.

BENEMEI, S. et al. The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 10, p. 2552–2567, maio 2014.

BENEMEI, S. et al. TRP channels. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 22, p. 18–23, jun. 2015.

BENEMEI, S. et al. The anti-migraine component of butterbur extracts, isopetasin, desensitizes peptidergic nociceptors by acting on TRPA1 cation channel. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 17, p. 2897–2911, 2017.

BENNETT, D. L. H.; WOODS, C. G. Painful and painless channelopathies. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 6, p. 587–599, 2014.

BHATTACHARYA, M. R. C. et al. Radial stretch reveals distinct populations of mechanosensitive mammalian somatosensory neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 50, p. 20015–20, 16 dez. 2008.

BIBLE, E. Pain: Comorbidity of neuropathic pain and migraine in patients with multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 10, p. 544, 2013.

BJELOBABA, I. et al. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroscience Research**, v.

96, n. 6, p. 1021–1042, 2018.

BLASER, L. S. et al. Comparative Effects of Metamizole (Dipyrone) and Naproxen on Renal Function and Prostacyclin Synthesis in Salt-Depleted Healthy Subjects - A Randomized Controlled Parallel Group Study. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 246–255, 1 mar. 2021a.

BLASER, L. S. et al. Comparative Effects of Metamizole (Dipyrone) and Naproxen on Renal Function and Prostacyclin Synthesis in Salt-Depleted Healthy Subjects - A Randomized Controlled Parallel Group Study. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 2313, 7 set. 2021b.

BLISS, T. V. P. et al. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 485–496, 2016.

BÖLCSKEI, K. et al. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 320, p. 1–10, 15 jul. 2018.

BORKUM, J. M. Migraine Triggers and Oxidative Stress: A Narrative Review and Synthesis. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 56, n. 1, p. 12–35, jan. 2016.

BORKUM, J. M. CGRP and Brain Functioning: Cautions for Migraine Treatment. **Headache**, v. 59, n. 8, p. 1339–1357, 2019.

BOSSON, A. et al. TRPA1 channels promote astrocytic Ca²⁺ hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 53, 6 dez. 2017.

BOYETTE-DAVIS, J. A.; WALTERS, E. T.; DOUGHERTY, P. M. **Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy Pain management** NIH Public Access, , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26087973>>. Acesso em: 3 nov. 2018

BRAMBILLA, R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Acta Neuropathologica**, v. 137, n. 5, p. 757–783, 2019.

BREIVIK, H. International association for the study of pain: Update on WHO-IASP activities. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 24, n. 2, p. 97–101, 2002.

BROWN, T. R.; SLEE, A. A randomized placebo-controlled trial of duloxetine for central pain in multiple sclerosis. **International journal of MS care**, v. 17, n. 2, p. 83–

9, 2015.

BURDAN, F. Developmental effects of propyphenazone in analgesic and antipyretic combination with caffeine or paracetamol. **Human and Experimental Toxicology**, v. 23, n. 5, p. 235–244, maio 2004.

BURNS, T. et al. Neuronopathy in the motor neocortex in a chronic model of multiple sclerosis. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 73, n. 4, p. 335–344, 2014.

CASPANI, O. et al. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. **PloS one**, v. 4, n. 10, p. e7383, 8 out. 2009.

CHALK, J. B. et al. Clinical and histological findings in proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in the Lewis rat. Distribution of demyelination differs from that in EAE induced by other antigens. **Journal of the neurological sciences**, v. 123, n. 1–2, p. 154–61, maio 1994.

CHEN, A. Y.; CHONGHASAWAT, A. O.; LEADHOLM, K. L. Multiple sclerosis: Frequency, cost, and economic burden in the United States. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 45, p. 180–186, 1 nov. 2017.

CHEN, J. et al. Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. **Pain**, v. 152, n. 5, p. 1165–1172, maio 2011.

CHEN, J. et al. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. **Nature Communications**, p. 660–751, 2013.

CHEN, Q. L.; HEINRICHER, M. M. **Descending Control Mechanisms and Chronic Pain** *Current Rheumatology Reports* Curr Rheumatol Rep, , 1 maio 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30830471/>>. Acesso em: 15 abr. 2022

CHINNASAMY, P. et al. Loss of allograft inflammatory factor-1 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by limiting encephalitogenic CD4 T-cell expansion. **Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 233–241, 2015.

COLÁS CHACARTEGUI, R. et al. Abuse pattern of analgesics in chronic daily headache: A study in the general population. **Revista Clinica Espanola**, v. 205, n. 12, p. 583–587, 2005.

COLVIN, L. A. **Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Where are we now?** *Pain*, maio 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31008843>>. Acesso em: 13 out. 2019

COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 372, n. 9648, p. 1502–1517, 2008.

CONSTANTINESCU, C. S. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, 2011.

CORDERO-ERAUSQUIN, M. et al. Neuronal networks and nociceptive processing in the dorsal horn of the spinal cord. **Neuroscience**, v. 338, n. September, p. 230–247, 2016.

COREY, D. P. et al. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 723–730, 9 dez. 2004.

DA COSTA, D. S. M. et al. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**, v. 148, n. 3, p. 431–437, mar. 2010.

DA GAMA PEREIRA, A. B. C. N. et al. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 4, n. 6, p. 572–579, 2015.

DAI, Y. TRPs and pain. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 3, p. 277–291, 2016.

DALENOGARE, D. P. et al. TRPA1 activation mediates nociception behaviors in a mouse model of relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. **Experimental Neurology**, v. 328, p. 113241, 1 jun. 2020.

DALENOGARE, D. P. D. P. et al. Periorbital Nociception in a Progressive Multiple Sclerosis Mouse Model Is Dependent on TRPA1 Channel Activation. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 8, p. 831, 23 ago. 2021.

DANESHDOUST, D. et al. Pregabalin enhances myelin repair and attenuates glial activation in lyssolecithin-induced demyelination model of rat optic chiasm. **Neuroscience**, v. 344, p. 148–156, 6 mar. 2017.

DARIO, A.; TOMEI, G. **Management of spasticity in multiple sclerosis by intrathecal baclofen** *Acta Neurochirurgica, Supplementum* Vienna Springer Vienna, , 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17691376>>. Acesso em: 23 set. 2019

DE ALMEIDA, A. S. et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma. **Pharmacological**

research, v. 152, p. 104576, 1 fev. 2020.

DE LOGU, F. et al. TRPA1 Mediates Aromatase Inhibitor–Evoked Pain by the Aromatase Substrate Androstenedione. **Cancer Research**, v. 76, n. 23, p. 7024–7035, dez. 2016.

DE LOGU, F. et al. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1887, 1 dez. 2017.

DE LOGU, F. et al. Pathways of CGRP Release from Primary Sensory Neurons. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 255, p. 65–84, 2018.

DE LOGU, F. et al. Schwann cells expressing nociceptive channel TRPA1 orchestrate ethanol-evoked neuropathic pain in mice. **Journal of Clinical Investigation**, 2019a.

DE LOGU, F. et al. Migraine-provoking substances evoke periorbital allodynia in mice. **The Journal of Headache and Pain**, v. 1, p. 1–9, 2019b.

DE LOGU, F. et al. Macrophages and Schwann cell TRPA1 mediate chronic allodynia in a mouse model of complex regional pain syndrome type I. **Brain, behavior, and immunity**, v. 88, p. 535–546, 1 ago. 2020a.

DE LOGU, F. et al. Oxidative stress mediates thalidomide-induced pain by targeting peripheral TRPA1 and central TRPV4. **BMC biology**, v. 18, n. 1, 1 dez. 2020b.

DE SOUZA CARVALHO, D. et al. **Efficacy and tolerability of combined dipyrrone, isometheptene and caffeine in the treatment of mild-to-moderate primary headache episodes** *Expert Review of Neurotherapeutics* *Expert Rev Neurother*, , fev. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22288671/>>. Acesso em: 11 ago. 2020

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of MS. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.

DOOLEN, S. et al. Fingolimod reduces neuropathic pain behaviors in a mouse model of multiple sclerosis by a sphingosine-1 phosphate receptor 1-dependent inhibition of central sensitization in the dorsal horn. **Pain**, v. 159, n. 2, p. 224–238, 1 fev. 2018.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors : the sensors of the pain pathway Find the latest version : Review series Nociceptors : the sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.

DUFFY, S. S. et al. Peripheral and central neuroinflammatory changes and pain behaviors in an animal model of multiple sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. SEP, p. 22, 22 set. 2016.

DUFFY, S. S. et al. Regulatory T cells and their derived cytokine, interleukin-35, reduce pain in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 12, p. 2326–2346, 20 mar. 2019.

DUITAMA, M. et al. **TRP Channels Role in Pain Associated With Neurodegenerative Diseases** **Frontiers in Neuroscience**, 2020. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 17 abr. 2022

DUNHAM, J. P.; KELLY, S.; DONALDSON, L. F. Inflammation reduces mechanical thresholds in a population of transient receptor potential channel A1-expressing nociceptors in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 12, p. 3151–3160, jun. 2008.

EARLEY, S. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by transient receptor potential and Ca²⁺-activated K⁺ channels. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 148–53, fev. 2011.

EBERHARDT, M. et al. H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. **Nature Communications**, v. 5, p. 4381, 15 jul. 2014.

EDELMAYER, R. M. et al. Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in Headache-Related pain. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 2, p. 184–193, fev. 2009.

EDELMAYER, R. M. et al. Activation of TRPA1 on dural afferents: A potential mechanism of headache pain. **Pain**, v. 153, n. 9, p. 1949–1958, set. 2012.

EDVINSSON, L. The Trigeminovascular Pathway: Role of CGRP and CGRP Receptors in Migraine. **Headache**, v. 57, p. 47–55, 2017.

EDVINSSON, L. et al. CGRP as the target of new migraine therapies - Successful translation from bench to clinic. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 6, p. 338–350, 2018.

EHDE, D. M. et al. **Chronic pain secondary to disability: A review** **Clinical Journal of Pain** Clin J Pain, , jan. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12514452/>>. Acesso em: 10 abr. 2022

EID, S. R. et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. **Molecular Pain**, v. 4, 27 out. 2008.

FAISSNER, S. et al. **Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies***Nature Reviews Drug Discovery* Nat Rev Drug Discov, , 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31399729/>>. Acesso em: 14 abr. 2022

FERNANDES, E. S. et al. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 3, p. 819–829, 2011.

FERNANDEZ-DE-LAS-PENAS, C. et al. Widespread pressure pain hypersensitivity in patients with multiple sclerosis with and without pain as sign of central sensitization. **Clinical Journal of Pain**, v. 31, n. 1, p. 66–72, 2015.

FERRARO, D. et al. Systematic assessment and characterization of chronic pain in multiple sclerosis patients. **Neurological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 445–453, 9 mar. 2018.

FILIPPI, M. et al. Multiple sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2018.

FINNERUP, N. B. et al. Neuropathic pain: An updated grading system for research and clinical practice. **Pain**, v. 157, n. 8, p. 1599–1606, 8 jun. 2016.

FITZCHARLES, M. A. et al. **Nociplastic pain: towards an understanding of prevalent pain conditions***The Lancet* Lancet, , 29 maio 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34062144/>>. Acesso em: 14 abr. 2022

FOLEY, P. L. et al. Prevalence and natural history of pain in adults with multiple sclerosis: Systematic review and meta-analysis. **Pain**, v. 154, n. 5, p. 632–642, maio 2013.

FUSI, C. et al. Steroidal and non-steroidal third-generation aromatase inhibitors induce pain-like symptoms via TRPA1. **Nature Communications**, v. 5, p. 5736, dez. 2014.

GALEA, I.; WARD-ABEL, N.; HEESSEN, C. Relapse in multiple sclerosis. **BMJ (Online)**, v. 350, n. April, p. 1–8, 14 abr. 2015.

GEE, J. R. et al. The association of brainstem lesions with migraine-like headache: An imaging study of multiple sclerosis. **Headache**, v. 45, n. 6, p. 670–677, jun. 2005.

GENCER, A.; GUNDUZ, O.; ULUGOL, A. Involvement of Descending Serotonergic and Noradrenergic Systems and their Spinal Receptor Subtypes in the

Antinociceptive Effect of Dipyrone. **Drug Research**, v. 65, n. 12, p. 645–649, 3 fev. 2015.

GENTRY, C.; ANDERSSON, D. A.; BEVAN, S. TRPA1 mediates the hypothermic action of acetaminophen. **Scientific Reports**, v. 5, 31 jul. 2015.

GEPPETTI, P.; HOLZER, P. Neurogenic inflammation. 1996.

GRASSO, M. G. et al. Pain in multiple sclerosis: A clinical and instrumental approach. **Multiple Sclerosis**, v. 14, n. 4, p. 506–513, maio 2008.

GRUCHOT, J. et al. **The Molecular Basis for Remyelination Failure in Multiple Sclerosis** Cells, , 3 ago. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31382620/>>. Acesso em: 28 jan. 2022

GUO, J. et al. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor intrathecal injection on spinal dorsal horn glial fibrillary acidic protein expression in a rat model of neuropathic pain. **International Journal of Neuroscience**, v. 122, n. 7, p. 388–394, jul. 2012.

HADJIMICHAEL, O. et al. Persistent pain and uncomfortable sensations in persons with multiple sclerosis. **Pain**, v. 127, n. 1–2, p. 35–41, jan. 2007.

HAIDER, L. et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. **Brain: a journal of neurology**, v. 134, n. Pt 7, p. 1914–1924, jul. 2011.

HAMILTON, N. B. et al. Proton-gated Ca²⁺-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. **Nature**, v. 529, n. 7587, p. 523–527, 13 jan. 2016.

HARGREAVES, R.; OLESEN, J. Calcitonin Gene-Related Peptide Modulators – The History and Renaissance of a New Migraine Drug Class. **Headache**, v. 59, n. 6, p. 951–970, 2019.

HASSLER, S. N. et al. Protease activated receptor 2 (PAR2) activation causes migraine-like pain behaviors in mice. **Cephalalgia**, v. 39, n. 1, p. 111–122, 31 jan. 2019.

HAYASHIDA, K. I.; OBATA, H. Strategies to treat chronic pain and strengthen impaired descending noradrenergic inhibitory system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019.

HEARN, L.; DERRY, S.; MOORE, R. Single dose dipyrone (metamizole) for acute postoperative pain in adults. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 4, n. 4, p. CD011421, 20 abr. 2016.

HEIDARI, A. R. et al. Acylated and deacylated quillaja saponin-21 adjuvants

have opposite roles when utilized for immunization of C57BL/6 mice model with MOG 35-55 peptide. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 29, n. August 2018, p. 68–82, 2019.

HEINRICHER, M. M. Pain modulation and the transition from acute to chronic pain. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Adv Exp Med Biol, 2016. v. 904p. 105–115.

HEMMER, B.; KERSCHENSTEINER, M.; KORN, T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 406–419, 2015.

HILL, K.; SCHAEFER, M. TRPA1 is differentially modulated by the amphipathic molecules trinitrophenol and chlorpromazine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7145–7153, 2 mar. 2007.

HOHLFELD, R. et al. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. **The Lancet. Neurology**, v. 15, n. 2, p. 198–209, 1 fev. 2016.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 6, p. 411–21, jun. 2014.

HUANG, J. et al. A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 1659–1668, 1 out. 2019.

HUSAIN, F.; PARDO, G.; RABADI, M. Headache and Its Management in Patients With Multiple Sclerosis. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 20, n. 4, p. 10, 2018.

JAIN, A. et al. TRP-channel-specific cutaneous eicosanoid release patterns. **Pain**, v. 152, n. 12, p. 2765–2772, dez. 2011.

JAQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7325–33, 12 mar. 1999.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. **Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?** Pain. **Anais...Pain**, 2013Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792284/>>. Acesso em: 5 nov. 2021

JIANG, L. et al. ROS/TRPA1/CGRP signaling mediates cortical spreading depression. **Journal of Headache and Pain**, v. 20, n. 1, p. 25, 6 mar. 2019.

JORDT, S. E. et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, v. 427, n. 6971, p. 260–265, 15 jan. 2004.

JULIUS, D. TRP Channels and Pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, n. 1, p. 355–384, 6 out. 2013.

KANEKO, Y.; SZALLASI, A. **Transient receptor potential (TRP) channels: A clinical perspective****British Journal of Pharmacology** Br J Pharmacol, , 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24102319/>>. Acesso em: 17 abr. 2022

KARASHIMA, Y. et al. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 4, p. 1273–1278, 27 jan. 2009.

KASSUBEK, R. et al. GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. **Neuroscience Letters**, v. 657, n. MAY, p. 166–170, 2017.

KATSURA, H. et al. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Experimental Neurology**, v. 200, n. 1, p. 112–123, jul. 2006.

KHAN, N. et al. Antiallodynic effects of alpha lipoic acid in an optimized RR-EAE mouse model of MS-neuropathic pain are accompanied by attenuation of upregulated BDNF-TrkB-ERK signaling in the dorsal horn of the spinal cord. **Pharmacology research & perspectives**, v. 3, n. 3, p. e00137, jun. 2015.

KHAN, N. et al. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome as a potential target for multiple sclerosis induced central neuropathic pain. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 77–86, 1 fev. 2018.

KHAN, N.; WOODRUFF, T. M.; SMITH, M. T. Establishment and characterization of an optimized mouse model of multiple sclerosis-induced neuropathic pain using behavioral, pharmacologic, histologic and immunohistochemical methods. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 126, p. 13–27, 1 nov. 2014.

KIM, H. Y. et al. Characterization of dental nociceptive neurons. **Journal of dental research**, v. 90, n. 6, p. 771–6, jun. 2011.

KINDT, K. S. et al. Caenorhabditis elegans TRPA-1 functions in mechanosensation. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 568–577, maio 2007.

KISTER, I. et al. **Tension-type headache and migraine in multiple sclerosis****Current Pain and Headache Reports**Curr Pain Headache Rep, , dez. 2010.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20848239/>>. Acesso em: 14 maio. 2021

KOCH-HENRIKSEN, N.; SØRENSEN, P. S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 5, p. 520–532, 2010.

KOIVISTO, A. et al. Inhibiting TRPA1 ion channel reduces loss of cutaneous nerve fiber function in diabetic animals: Sustained activation of the TRPA1 channel contributes to the pathogenesis of peripheral diabetic neuropathy. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 1, p. 149–158, jan. 2012.

KOIVISTO, A. P. et al. **Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies** *Nature Reviews Drug Discovery* Nat Rev Drug Discov, , 1 jan. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34526696/>>. Acesso em: 15 abr. 2022

KONO, T. et al. Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small intestine. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 304, n. 4, 15 fev. 2013.

KOROLEVA, K. et al. Receptor Mechanisms Mediating the Pro-Nociceptive Action of Hydrogen Sulfide in Rat Trigeminal Neurons and Meningeal Afferents. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 27 jul. 2017.

KREMER, M. et al. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. **Neuroscience**, v. 338, p. 183–206, dez. 2016.

KREMER, M. et al. A dual noradrenergic mechanism for the relief of neuropathic allodynia by the antidepressant drugs duloxetine and amitriptyline. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 46, p. 9934–9954, 2018.

KRIEGER, S. C. et al. The topographical model of multiple sclerosis: A dynamic visualization of disease course. **Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation**, v. 3, n. 5, p. 279, 2016.

KRISZTA, G. et al. Investigation of Cuprizone-Induced Demyelination in mGFAP-Driven Conditional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Receptor Knockout Mice. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 81, 28 dez. 2019.

KUNKLER, P. E. et al. TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 38–44, jan. 2011.

KWAN, K. Y. et al. TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical

Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. **Neuron**, v. 50, n. 2, p. 277–289, 20 abr. 2006.

KWIATKOWSKI, K. et al. Bidirectional Action of Cenicriviroc, a CCR2/CCR5 Antagonist, Results in Alleviation of Pain-Related Behaviors and Potentiation of Opioid Analgesia in Rats With Peripheral Neuropathy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 3337, 21 dez. 2020.

KWILASZ, A. J. et al. Toll-like receptor 2 and 4 antagonism for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-related pain. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 93, p. 80–95, 1 mar. 2021.

LASSMANN, H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3116, 10 jan. 2019.

LAURSEN, W. J. et al. Species-specific temperature sensitivity of TRPA1. **Temperature**, v. 2, n. 2, p. 214–226, 2015.

LEE, K.-I. et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 92, 27 dez. 2016.

LEE, K. et al. **Functional Importance of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Neurological Disorders** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* *Front Cell Dev Biol*, , 4 mar. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33748103/>>. Acesso em: 13 dez. 2021

LEE, S. M. et al. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 45, n. 1–2, p. 45–49, 1 out. 2012.

LINNERBAUER, M.; WHEELER, M. A.; QUINTANA, F. J. **Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation** *Neuron*, , 25 nov. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32898475/>>. Acesso em: 23 nov. 2021

LIPTON, R. B.; BIGAL, M. E.; GOADSBY, P. J. **Double-blind clinical trials of oral triptans vs other classes of acute migraine medication - A review** *Cephalalgia* *Cephalalgia*, , 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15096220/>>. Acesso em: 11 abr. 2022

LIU, D. et al. Inhibition of TRPA1 and IL-6 signal alleviates neuropathic pain following chemotherapeutic Bortezomib. **Physiological Research**, v. 68, n. 5, p. 845–855, 2019.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. **The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology** *Pain*, 31 jul. 2008. Disponível em:

<<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006396-200807310-00005>>. Acesso em: 4 nov. 2018

MA, M. W. et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 1–28, 17 jan. 2017.

MADSEN, P. M. et al. Oligodendroglial TNFR2 mediates membrane TNF-dependent repair in experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting oligodendrocyte differentiation and remyelination. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 18, p. 5128–5143, 2016.

MAGGIO, M. G. et al. Virtual reality in multiple sclerosis rehabilitation: A review on cognitive and motor outcomes. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 65, p. 106–111, 1 jul. 2019.

MAGLIOZZI, R. et al. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 68, n. 4, p. 477–493, out. 2010.

MAHAD, D. H.; TRAPP, B. D.; LASSMANN, H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 183–193, 2015.

MAKKER, P. G. S. et al. Characterisation of immune and neuroinflammatory changes associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2017.

MARONE, I. M. et al. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice. **Brain**, v. 141, n. 8, p. 2312–2328, 2018.

MARRIE, R. A. et al. **The incidence and prevalence of psychiatric disorders in multiple sclerosis: A systematic review** *Multiple Sclerosis Journal* *Mult Scler*, , 16 mar. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25583845/>>. Acesso em: 10 abr. 2022

MARRIE, R. A. Comorbidity in multiple sclerosis: Implications for patient care. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 6, p. 375–382, 2017.

MATERAZZI, S. et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 463, n. 4, p. 561–569, 19 abr. 2012.

MATERAZZI, S. et al. Parthenolide inhibits nociception and neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system by targeting the TRPA1 channel. **Pain**, v. 154, n. 12, p. 2750–8, dez. 2013.

MAZHARI, A. Multiple Sclerosis-Related Pain Syndromes: An Imaging Update.

Current Pain and Headache Reports, v. 20, n. 12, 2016.

MCCARBERG, B.; PEPPIN, J. Pain Pathways and Nervous System Plasticity: Learning and Memory in Pain. **Pain Medicine (United States)**, v. 20, n. 12, p. 2421–2437, 1 dez. 2019.

MCGARAUGHTY, S. et al. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. **Molecular pain**, v. 6, p. 14, 5 mar. 2010.

MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 33, p. 13525–13530, 14 ago. 2007.

MEACHAM, K. et al. **Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms** **Current Pain and Headache Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11916-017-0629-5>>. Acesso em: 21 abr. 2022

MEENTS, J. E.; CIOTU, C. I.; FISCHER, M. J. M. **Trpa1: A molecular view** **Journal of Neurophysiology** J Neurophysiol, , 1 fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30485151/>>. Acesso em: 23 maio. 2022

MEOTTI, F. C. et al. The transient receptor potential ankyrin-1 mediates mechanical hyperalgesia induced by the activation of B1 receptor in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 125, p. 75–83, 1 fev. 2017.

MEOTTI, F. C.; LEMOS DE ANDRADE, E.; CALIXTO, J. B. TRP Modulation by Natural Compounds. In: **Handbook of experimental pharmacology**. [s.l.] Springer, Cham, 2014. v. 223p. 1177–1238.

MERKLER, D. et al. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. **Annals of neurology**, v. 66, n. 3, p. 355–365, 2009.

MINEN, M. T. et al. Migraine and its psychiatric comorbidities. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 87, n. 7, p. 741–749, jul. 2016.

MIRABELLI, E.; ELKABES, S. Neuropathic Pain in Multiple Sclerosis and Its Animal Models: Focus on Mechanisms, Knowledge Gaps and Future Directions. **Frontiers in Neurology**, v. 12, p. 2300, 16 dez. 2021.

MIYAMOTO, T. et al. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7596, 29 out. 2009.

MÖHRKE, J.; KROPP, P.; ZETTL, U. K. Headaches in Multiple Sclerosis Patients Might Imply an Inflammatorial Process. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 69570, 5

ago. 2013.

MORAN, M. M.; SZALLASI, A. **Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field***British Journal of Pharmacology* Br J Pharmacol, , 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28924972/>>. Acesso em: 17 abr. 2022

MOTL, R. W.; SUH, Y.; WEIKERT, M. Symptom Cluster and Quality of Life in Multiple Sclerosis. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 39, n. 6, p. 1025–1032, 2010.

MURPHY, K. L.; BETHEA, J. R.; FISCHER, R. **Neuropathic Pain in Multiple Sclerosis—Current Therapeutic Intervention and Future Treatment Perspectives**. [s.l.] Codon Publications, 2017.

NAERT, R.; LÓPEZ-REQUENA, A.; TALAVERA, K. TRPA1 Expression and Pathophysiology in Immune Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11460, 2021.

NASSINI, R. et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. **Pain**, v. 152, n. 7, p. 1621–31, jul. 2011.

NASSINI, R. et al. The ‘headache tree’ via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. **Brain**, v. 135, n. 2, p. 376–390, 1 fev. 2012.

NASSINI, R. et al. The TRPA1 Channel in Inflammatory and Neuropathic Pain and Migraine. In: **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**. Germany: Berlin, New York, Springer-Verlag, 2014. v. 167p. 1–43.

NASSINI, R. et al. The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 3397, 2015.

NATALE, M. et al. Long-term effects of intrathecal baclofen in multiple sclerosis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 143, p. 121–125, abr. 2016.

NEGROTTO, L.; CORREALE, J. Evolution of multiple sclerosis prevalence and phenotype in Latin America. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 22, n. February, p. 97–102, 2018.

NICOLETTI, A. et al. Headache and multiple sclerosis: A population-based case-control study in Catania, Sicily. **Cephalalgia**, v. 28, n. 11, p. 1163–1169, nov. 2008.

NIELSEN, S. et al. The Use of Cannabis and Cannabinoids in Treating Symptoms of Multiple Sclerosis: a Systematic Review of Reviews. **Current Neurology**

and **Neuroscience Reports**, v. 18, n. 2, p. 8, 13 fev. 2018.

NILIJUS, J. et al. **Nociceptive pain criteria or recognition of central sensitization? Pain phenotyping in the past, present and future** *Journal of Clinical Medicine*, Clin Med, , 1 ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34361986/>>. Acesso em: 14 abr. 2022

NILIJUS, B.; APPENDINO, G.; OWSIANIK, G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. **Pflügers Archiv : European journal of physiology.**, v. 464(5), p. 425–58, 2012.

NILIJUS, B.; OWSIANIK, G. **The transient receptor potential family of ion channels** *Genome Biology*, 17 mar. 2011.

NILIJUS, B.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 3, p. 676–814, 20 jul. 2014.

O'CONNOR, A. B. et al. Pain associated with multiple sclerosis: Systematic review and proposed classification. **Pain**, v. 137, n. 1, p. 96–111, 30 jun. 2008.

OBATA, K. et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2393–2401, 2005.

OGAWA, N.; KUROKAWA, T.; MORI, Y. **Sensing of redox status by TRP channels** *Cell Calcium* Elsevier Ltd, , 1 ago. 2016.

OH, J.; O'CONNOR, P. W. Multiple sclerosis in 2014: Progress in MS-classification, mechanisms and treatment. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 2, p. 76–78, 2015.

OH, J.; VIDAL-JORDANA, A.; MONTALBAN, X. Multiple sclerosis: Clinical aspects. **Current Opinion in Neurology**, v. 31, n. 6, p. 752–759, 2018.

OHSAWA, K. et al. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, n. 4, p. 844–856, 2004.

OLECHOWSKI, C. J. et al. Changes in nociceptive sensitivity and object recognition in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Experimental Neurology**, v. 241, p. 113–121, mar. 2013.

OLECHOWSKI, C. J.; TRUONG, J. J.; KERR, B. J. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Pain**, v. 141, n. 1–2, p. 156–164, 2009.

OLIVEIRA, A. B. et al. Unbalanced plasma TNF- α and IL-12/IL-10 profile in women with migraine is associated with psychological and physiological outcomes. **Journal of neuroimmunology**, v. 313, p. 138–144, 2017.

OLSSON, T.; BARCELLOS, L. F.; ALFREDSSON, L. **Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis** *Nature Reviews Neurology* Nature Publishing Group, , 9 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrneurol.2016.187>>. Acesso em: 13 abr. 2022

OLUKMAN, M. et al. Treatment with NADPH oxidase inhibitor apocynin alleviates diabetic neuropathic pain in rats. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 9, p. 1657, set. 2018.

ORR, P. M.; SHANK, B. C.; BLACK, A. C. **The Role of Pain Classification Systems in Pain Management** *Critical Care Nursing Clinics of North America* Elsevier, , 1 dez. 2017.

OSSIPOV, M. H. et al. Central modulation of pain Find the latest version : Review series Central modulation of pain. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.

ÖSTERBERG, A.; BOIVIE, J. Central pain in multiple sclerosis – Sensory abnormalities. **European Journal of Pain**, v. 14, n. 1, p. 104–110, 2010.

ÖSTERBERG, A.; BOIVIE, J.; THUOMAS, K. Å. Central pain in multiple sclerosis - Prevalence and clinical characteristics. **European Journal of Pain**, v. 9, n. 5, p. 531–542, 2005.

OTHMAN, A. et al. Olig1 is expressed in human oligodendrocytes during maturation and regeneration. **GLIA**, p. 914–926, jun. 2011.

OWSIANIK, G. et al. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 156, p. 61–90, 2006.

PAKPOOR, J. et al. Meta-Analysis of the Relationship between Multiple Sclerosis and Migraine. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 14 set. 2012.

PARK, J. et al. Acrolein contributes to TRPA1 up-regulation in peripheral and central sensory hypersensitivity following spinal cord injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, n. 5, p. 987–997, 1 dez. 2015.

PATTI, F. et al. Frequency and severity of headache is worsened by Interferon- β therapy in patients with multiple sclerosis. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 125, n. 2, p. 91–5, fev. 2012.

PAUMIER, A. et al. Astrocyte–neuron interplay is critical for Alzheimer’s disease pathogenesis and is rescued by TRPA1 channel blockade. **Brain**, v. 145, n. 1, p. 388–405, 29 mar. 2022.

PEIRIS, M. et al. A model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice for the characterisation of intervention therapies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 163, n. 2, p. 245–254, 2007.

PEREIRA, L. G. et al. Interferon-beta injection in multiple sclerosis patients is related to the induction of headache and flu-like pain symptoms: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Current Neuropharmacology**, v. 19, 1 nov. 2021.

PESCHL, P. et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: Deciphering a target in inflammatory demyelinating diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAY, p. 1–15, 2017.

PETRUS, M. et al. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Molecular Pain**, v. 3, 17 dez. 2007.

RACKE, M. K.; FROHMAN, E. M.; FROHMAN, T. Pain in Multiple Sclerosis: Understanding Pathophysiology, Diagnosis, and Management Through Clinical Vignettes. **Frontiers in neurology**, v. 12, 13 jan. 2022.

RAHN, E. J. et al. Sex differences in a mouse model of multiple sclerosis: neuropathic pain behavior in females but not males and protection from neurological deficits during proestrus. **Biology of sex differences**, v. 5, n. 1, p. 4, 28 fev. 2014.

RAJA, S. N. et al. **The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises** *Pain*, , 1 set. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32694387/>>. Acesso em: 14 abr. 2022

RAMACCIOTTI, A. S.; SOARES, B. G. O.; ATALLAH, A. N. Dipyrone for acute primary headaches. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 2, 2007.

RASMUSSEN, S. et al. Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing--remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain : a journal of neurology**, v. 130, n. Pt 11, p. 2816–29, nov. 2007.

RIGO, F. K. et al. Effect of ω -conotoxin MVIIA and Phc1 β on paclitaxel-induced acute and chronic pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 114–115, p. 16–22, dez. 2013.

RITTER, C. et al. Nociception in a Progressive Multiple Sclerosis Model in Mice Is Dependent on Spinal TRPA1 Channel Activation. **Molecular neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2420–2435, fev. 2020.

ROBERTO, G. et al. Adverse cardiovascular events associated with triptans and ergotamines for treatment of migraine: Systematic review of observational studies. **Cephalalgia**, v. 35, n. 2, p. 118–131, 2015.

ROJEWSKA, E. et al. Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 80–91, 1 mar. 2016.

ROVARIS, M. et al. Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed. v. 5, n. April, 2006.

RUSSO, M. et al. Evaluating Sativex[®] in Neuropathic Pain Management: A Clinical and Neurophysiological Assessment in Multiple Sclerosis. **Pain Medicine**, p. pnv080, 13 jan. 2016.

SAENGJAROENTHAM, C. et al. Differential medication overuse risk of novel anti-migraine therapeutics. **Brain : a journal of neurology**, v. 143, n. 9, p. 2681–2688, 1 set. 2020.

SAFAEI, H. A.; EFTEKHARI, S. M.; ALIOMRANI, M. Analysis of platelet-derived growth factor receptor A and oligodendrocyte transcription factor 2 markers following Hydroxychloroquine administration in animal induced multiple sclerosis model. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 7, p. 2101–2110, 1 out. 2021.

SÁGHY, É. et al. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination???A new target against oligodendrocyte apoptosis. **Glia**, v. 64, n. 12, p. 2166–2180, 1 dez. 2016.

SAMAD, A. et al. The C-terminal basic residues contribute to the chemical- and voltage-dependent activation of TRPA1. **The Biochemical journal**, v. 433, n. 1, p. 197–204, 1 jan. 2011.

SAMMARAIEE, Y. et al. Intrathecal baclofen for multiple sclerosis related spasticity: A twenty year experience. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 27, p. 95–100, jan. 2019.

SAMRA, A.; RAMTAHAL, J. Sumatriptan can inhibit trigeminal afferents by an exclusively neural mechanism. **Brain**, v. 139, n. 4, p. 16–17, 2012.

SAWADA, Y. et al. Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. **Brain research**, v. 1160, p. 39–46, 30 jul. 2007.

SCHOU, W. S. et al. **Calcitonin gene-related peptide and pain: a systematic review***Journal of Headache and Pain*, , 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28303458/>>. Acesso em: 15 abr. 2022

SCHWENKENBECHER, P. et al. Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. March, p. 1–8, 2019.

SHI, L. et al. Acrolein scavenger dimercaprol offers neuroprotection in an animal model of Parkinson's disease: implication of acrolein and TRPA1. **Translational Neurodegeneration**, v. 10, n. 1, dez. 2021.

SHIGETOMI, E. et al. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 70–80, jan. 2011.

SHORT, G. et al. Coactivation of TRPA1/TRPV1 and its potential impact on CRAMPS, SPASMS, spasticity and pain in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurology**, v. 90, n. 15, 2018.

SILBERSTEIN, S. D. **Preventive migraine treatment***CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*Continuum (Minneap Minn), , 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26252585/>>. Acesso em: 11 abr. 2022

SOLARO, C. et al. Antiepileptic medications in multiple sclerosis: adverse effects in a three-year follow-up study. **Neurological Sciences**, v. 25, n. 6, p. 307–310, fev. 2005.

SOLARO, C. et al. Identifying neuropathic pain in patients with multiple sclerosis: a cross-sectional multicenter study using highly specific criteria. **Journal of Neurology**, v. 265, n. 4, p. 828–835, 1 abr. 2018.

SOLARO, C.; MESSMER UCCELLI, M. Management of pain in multiple sclerosis: a pharmacological approach. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 9, p. 519–527, 16 set. 2011.

SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO, D. et al. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 24, n. 10, p. 997–1008, 2 out. 2020.

ST. JOHN SMITH, E. **Advances in understanding nociception and neuropathic pain***Journal of Neurology*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00415-017-8641-6>>. Acesso em: 14 abr. 2022

STAAF, S. et al. Differential regulation of TRP channels in a rat model of

neuropathic pain. **Pain**, v. 144, n. 1–2, p. 187–199, 2009.

STARUSCHENKO, A.; JESKE, N. A.; AKOPIAN, A. N. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 20, p. 15167–15177, 14 maio 2010.

STORY, G. M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 819–29, 21 mar. 2003.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Frontiers in Neuroscience Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. In: LIEDTKE, W. B.; HELLER, S. (Eds.). . **TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades**. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis/Taylor & Francis Group, LLC., 2007.

TAKIZAWA, M. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 channels are involved in spontaneous peptide hormone release from astrocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 501, n. 4, p. 988–995, 2 jul. 2018.

TANG, CHUNHUA et al. cortical spreading depolarisation-induced facial hyperalgesia, photophobia and hypomotility are ameliorated by sumatriptan and olcegepant. v. 10, p. 11408, 2020.

TERRIER, L. M.; HADJIKHANI, N.; DESTRIEUX, C. **The trigeminal pathways** **Journal of Neurology**, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00415-022-11002-4>>. Acesso em: 24 maio. 2022

THOMPSON et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria THOMPSON, A. J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 2, p. 162–173, 2018. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 2, p. 162–173, 2018a.

THOMPSON et al. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1622–1636, abr. 2018b.

THORLUND, K. et al. **Comparative tolerability of treatments for acute migraine: A network meta-analysis** **Cephalalgia** SAGE Publications Ltd, , 1 set. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521843>>. Acesso em: 24 abr. 2020

TIAN, C. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 contributes to the lysophosphatidylcholine-induced oxidative stress and cytotoxicity in OLN-93 oligodendrocyte. **Cell Stress and Chaperones**, v. 25, n. 6, p. 955–968, 1 nov. 2020.

TOBORE, T. O. **Oxidative/Nitroxidative Stress and Multiple Sclerosis** **Journal of Molecular Neuroscience** J Mol Neurosci, , 1 mar. 2021.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32767188/>>. Acesso em: 3 abr. 2022

TREVISAN, G. et al. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. **Cancer research**, v. 73, n. 10, p. 3120–31, 15 maio 2013a.

TREVISAN, G. et al. A novel, potent, oral active and safe antinociceptive pyrazole targeting kappa opioid receptors. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 261–273, out. 2013b.

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 and Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2984–2995, 1 nov. 2013c.

TREVISAN, G. et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes / macrophages and oxidative stress. **Brain**, v. 139, n. 5, p. 1361–1377, 2016.

TREVISANI, M. et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13519–13524, 14 ago. 2007.

TRUINI, A. et al. Mechanisms of pain in multiple sclerosis: a combined clinical and neurophysiological study. **Pain**, v. 153, n. 10, p. 2048–54, out. 2012.

TRUINI, A. et al. **A mechanism-based classification of pain in multiple sclerosis** *Journal of Neurology*, 2013.

URITS, I. et al. **Advances in the Understanding and Management of Chronic Pain in Multiple Sclerosis: a Comprehensive Review** *Current Pain and Headache Reports* Current Medicine Group LLC 1, , 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11916-019-0800-2>>. Acesso em: 22 fev. 2021

VERRIOTIS, M. et al. The development of the nociceptive brain. **Neuroscience**, v. 338, n. July, p. 207–219, 2016.

VIEIRA, M. C. et al. Antinociceptive Effect of Lodenafil Carbonate in Rodent Models of Inflammatory Pain and Spinal Nerve Ligation-Induced Neuropathic Pain. **Journal of pain research**, v. 14, p. 857–866, 2021.

VILLANI, V. et al. The impact of interferon beta and natalizumab on comorbid migraine in multiple sclerosis. **Headache**, v. 52, n. 7, p. 1130–5, 2012.

VOLLMER, T. L. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of duloxetine for the treatment of pain in patients with multiple sclerosis. **Pain practice : the official journal of World Institute of Pain**, v. 14, n. 8, p. 732–44, nov. 2014.

VON HEHN, C. A.; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 638–52, 23 fev. 2012.

VOSKUHL, R. R.; SAWALHA, A. H.; ITOH, Y. Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. **Multiple Sclerosis**, v. 24, n. 1, p. 22–31, 2018.

WANG, F. et al. Association of serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 with migraine. **Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 36, n. 4, p. 535–40, abr. 2015.

WANG, I.-C. et al. Peripheral sensory neuron injury contributes to neuropathic pain in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 42304, p. 1–14, 2017.

WANG, J. et al. L6 spinal nerve ligation produces prolonged development of mechanical allodynia and gradual increase of GFAP on ipsilateral dorsal horn. **Acta Neurochirurgica**, v. 155, n. 5, p. 935–940, 1 maio 2013.

WANG, L. et al. **The epidemiology of primary headaches in patients with multiple sclerosis** *Brain and Behavior* Brain Behav, , 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33295123/>>. Acesso em: 14 abr. 2022

WEI, H. et al. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. **Anesthesiology**, v. 111, n. 1, p. 147–54, jul. 2009.

WOODRUFF, R. H.; FRANKLIN, R. J. M. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study. **GLIA**, v. 25, n. 3, p. 216–228, 1 fev. 1999.

WOOLF, C. J. Review series introduction What is this thing called pain ? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 10–12, 2010.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, n. 3 Suppl, mar. 2011.

YAM, M. F. et al. **General pathways of pain sensation and the major**

neurotransmitters involved in pain regulation *International Journal of Molecular Sciences* Int J Mol Sci, , 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30042373/>>. Acesso em: 14 abr. 2022

YI, W.; SCHLÜTER, D.; WANG, X. **Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity** *Brain, Behavior, and Immunity* Brain Behav Immun, , 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31125711/>>. Acesso em: 23 nov. 2021

ZAPPIA, K. J. et al. Sensory neuron-specific deletion of TRPA1 results in mechanical cutaneous sensory deficits. *eNeuro*, v. 4, n. 1, 10 fev. 2017.

ZHAO, Y.; MCVEIGH, B. M.; MOISEENKOVA-BELL, V. Y. Structural Pharmacology of TRP Channels. *Journal of molecular biology*, v. 433, n. 17, 20 ago. 2021.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSM REFERENTE AOS TESTES UTILIZADOS NO ARTIGO 1



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Federal de Santa Maria*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos mecanismos envolvidos na ativação do receptor TRPA1 na hipersensibilidade dolorosa observada em um modelo de esclerose múltipla", protocolada sob o CEUA nº 8640200617 (ID 001571), sob a responsabilidade de **Gabriela Trevisan dos Santos e equipe; Amanda Spring de Almeida; Fernando Roberto Antunes Fernando Bellinaso; Guilherme Vargas Bochi; Patricia Severo do Nascimento; Sabrina Qader Kudsi; Giovana Quaresma Ghedini; Caren Tatiane de David Antoniazzi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA da UFSM) na reunião de 09/08/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the mechanisms involved in TRPA1 receptor activation in the painful hypersensitivity observed in a multiple sclerosis model", utilizing 384 Isogenics mice (384 females), protocol number CEUA 8640200617 (ID 001571), under the responsibility of **Gabriela Trevisan dos Santos and team; Amanda Spring de Almeida; Fernando Roberto Antunes Fernando Bellinaso; Guilherme Vargas Bochi; Patricia Severo do Nascimento; Sabrina Qader Kudsi; Giovana Quaresma Ghedini; Caren Tatiane de David Antoniazzi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA da UFSM) in the meeting of 08/09/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2017](#) a [03/2021](#) Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [50 a 60 dias](#)

N: [384](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [20 a 30 g](#)

Local do experimento: Laboratório Experimental da Fisiopatologia da Dor - Sala 5207 - Prédio 21

Santa Maria, 14 de abril de 2022

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSM REFERENTE AOS TESTES UTILIZADOS NO ARTIGO 2



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Federal de Santa Maria*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da participação de CGRP na nocicepção observada em modelos de esclerose múltipla em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 4522041219 (ID 003012), sob a responsabilidade de **Gabriela Trevisan dos Santos e equipe; Diéssica Padilha Dalenogare; Camila dos Santos Ritter; Maria Carolina Theisen** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA da UFSM) na reunião de 19/05/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of CGRP participation in the nociception observed in multiple sclerosis models in mice", utilizing 160 Isogenics mice (160 females), protocol number CEUA 4522041219 (ID 003012), under the responsibility of **Gabriela Trevisan dos Santos and team; Diéssica Padilha Dalenogare; Camila dos Santos Ritter; Maria Carolina Theisen** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA da UFSM) in the meeting of 05/19/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2020](#) a [12/2024](#) Área: [Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [30 a 70 dias](#)

N: [160](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Fisiopatologia da Dor (5206) - NeuronLab

Santa Maria, 13 de abril de 2022

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFSM REFERENTE AOS TESTES UTILIZADOS NO MANUSCRITO 1



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da participação do receptor TRPA1 na nocicepção observada em um modelo de esclerose múltipla progressiva em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 7218010817 (ID 001640), sob a responsabilidade de **Gabriela Trevisan dos Santos e equipe; Fernando Roberto Antunes Fernando Bellinaso; Caren Tatiane de David Antoniazzi; Amanda Spring de Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA da UFSM) na reunião de 14/09/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of TRPA1 receptor participation in nociception observed in a mice progressive multiple sclerosis model", utilizing 280 Isogenics mice (280 females), protocol number CEUA 7218010817 (ID 001640), under the responsibility of **Gabriela Trevisan dos Santos and team; Fernando Roberto Antunes Fernando Bellinaso; Caren Tatiane de David Antoniazzi; Amanda Spring de Almeida** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA da UFSM) in the meeting of 09/14/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2017](#) a [12/2019](#)

Área: [Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [50 a 60 dias](#)

N: [280](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

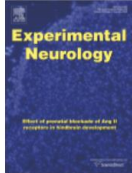
Local do experimento: Laboratório de Pesquisa Experimental da Fisiopatologia da Dor, prédio 21, UFSM.

Santa Maria, 14 de abril de 2022

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO D – DIREITOS AUTORIAIS DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA EXPERIMENTAL NEUROLOGY



TRPA1 activation mediates nociception behaviors in a mouse model of relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis

Author:

Diéssica Padilha Dalenogare, Maria Carolina Theisen, Diulle Spat Peres, Maria Fernanda Pessano Fialho, Débora Denardin Lückemeyer, Caren Tatiane de David Antoniazzi, Sabrina Qader Kudsi, Marcella de Amorim Ferreira, Camila dos Santos Ritter et al.

Publication: Experimental Neurology

Publisher: Elsevier

Date: June 2020

© 2020 Elsevier Inc.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

ANEXO E – DIREITOS AUTORIAIS DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA CIENTÍFICA PAIN®



Transient receptor potential ankyrin 1 mediates headache-related cephalic allodynia in a mouse model of relapsing–remitting multiple sclerosis

Author: Diéssica Dalenogare, Maria Theisen, Diulle Peres, et al

Publication: Pain

Publisher: Wolters Kluwer Health, Inc.

Date: Oct 26, 2021

Copyright © 2021, © 2022 International Association for the Study of Pain

License Not Required

Wolters Kluwer policy permits only the final peer-reviewed manuscript of the article to be reused in a thesis. You are free to use the final peer-reviewed manuscript in your print thesis at this time, and in your electronic thesis 12 months after the article's publication date. The manuscript may only appear in your electronic thesis if it will be password protected. Please see our Author Guidelines here: https://cdn-tp2.mozu.com/16833-m1/cms/files/Author-Document.pdf?_mzts=636410951730000000.

BACK

CLOSE WINDOW