



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE  
CINAMALDEÍDO EM CAMUNDONGOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Cássia Regina da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil, 2011**

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE  
CINAMALDEÍDO EM CAMUNDONGOS**

**por**

**Cássia Regina da Silva**

Dissertação apresentada no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

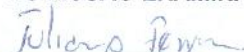
A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE  
CINAMALDEÍDO EM CAMUNDONGOS**

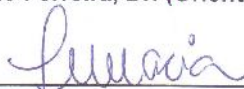
elaborada por  
**Cássia Regina da Silva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

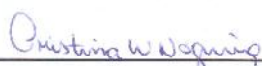
**COMISSÃO EXAMINADORA:**



**Juliano Ferreira, Dr. (Orientador)**



**Maria Fernanda de Paula Werner, Dra. (UFPR)**



**Cristina Wayne Nogueira, Dra. (UFSM)**

**Santa Maria, 30 de março de 2011**

## AGRADECIMENTOS

Uma vez uma amiga propôs que a vida é uma peça de teatro, onde se encerram os atos, mudam os coadjuvantes e até o cenário. Esta mesma amiga frisou que apenas o protagonista permanecia, e a categoria da peça era da escolha dele. Confesso que até hoje sinto dificuldades em dizer qual a categoria que se encaixa esta peça, no momento está mais para um suspense.

E assim, a 5 anos o cenário no qual mais atuo é o do laboratório, e após vários ensaios é chegada a hora de encerrar mais um ato. Como cheguei aqui totalmente sem experiência, vinda do interior, onde eu não tinha conhecimento do quão intrigante, enlouquecedora e apaixonante poderia ser esta vida, tenho muito a agradecer. Não porque é de praxe nesta hora, mas porque não posso seguir adiante ignorando todos que de alguma forma colaboraram para as minhas certezas.

Em primeiro lugar quero agradecer a minha família. Sem uma base sólida não se constrói nada. Sou fincada em alicerces sólidos, e ter apoio incondicional para as escolhas que faço na vida me permite a tranqüilidade e confiança que preciso para alcançar meus sonhos. Amo a todos, fica com eles o efeito especial, nos quais em dias de chuva não esqueceram do arco-íris.

Depois ao Marcelo, sempre me incentivando e acalmando. Ele foi quase tão responsável quanto eu por este momento, sem ele ao meu lado tudo teria tido menos cor, leveza e intensidade. Foi o responsável pela edição de imagens, onde cada imperfeição foi cuidadosamente suavizada.

Agradeço aos amigos de Campina, que sempre me mantiveram com saudades. Aos que fiz durante a caminhada, que não me deixaram perder o brilho. Abro um espaço para citar a Fernanda, o André, a Sara e a Fran, responsáveis pela harmonia em cena. As gurias de “casa”, por serem minha família, meu lar. Em

especial a Regina, que até me confundiu, me fazendo acreditar ser parte de uma peça de dupla personalidade. A eles devo a trilha sonora.

Aos colegas de trabalho, pois sem um ambiente propício não seria nada bom realizar as tarefas. Agradeço por lidarem tão bem com minha personalidade forte e meu exceço de “sinceridade”. Entre eles a minha querida amiga Gerusa, dona da idéia inicial deste agradecimento, meu primeiro contato no laboratório. Todos foram os coadjuvantes que mais contracenei, e apesar de errarmos algumas falas sempre conseguimos completar os diálogos.

Aos funcionários, responsáveis por armar o espaço cênico, colaborando cada um a sua maneira.

A Universidade Federal de Santa Maria por viabilizar a realização deste curso, bem como a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro como iniciação científica e mestrado.

E por fim ao grande diretor, quem maestrou a tudo com integridade, inteligência e facilidade. O professor Juliano foi um exemplo de pesquisador e espero ter correspondido pelo menos à parte de suas exigências. Passou conhecimento prático e teórico, instigou minha curiosidade e preocupou-se em indicar o próximo ato. Devo a ele muito desta conquista.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE CINAMALDEÍDO EM CAMUNDONGOS

Autor: Cássia Regina da Silva

Orientador: Juliano Ferreira

Data e Local da defesa: Santa Maria, 30 de março de 2011.

O cinamaldeído é um composto natural frequentemente encontrado em formulações cosméticas, capaz de induzir irritação na pele quando aplicado topicamente, porém o mecanismo pelo qual o cinamaldeído produz estas reações ainda é desconhecido. Neste trabalho demonstramos que o cinamaldeído foi capaz de induzir edema de orelha em camundongos (1-6 µg/orelha) com um efeito máximo obtido com a dose de 4 µg/orelha ( $E_{max}$  de  $0,18 \pm 0,02$  mm e um  $DE_{50}$  de 2,0 (1,1- 3,4) µg/orelha). O cinamaldeído foi capaz ainda de induzir infiltração leucocitária detectada por um aumento na atividade da MPO e confirmada por análise histológica. O edema e a infiltração leucocitária iniciados após aplicação tópica de 4 µg/orelha de cinamaldeído foi prevenido pela aplicação tópica de vermelho de rutênio, um antagonista TRP não seletivo, e por cânfora e HC030031, dois antagonistas seletivos TRPA1. Por outro lado, a aplicação de SB366791, um antagonista seletivo TRPV1, não alterou o edema nem a infiltração leucocitária. Ainda, o edema induzido pelo cinamaldeído foi prevenido pela aplicação tópica de aprepitant, um antagonista seletivo do receptor NK1 para taquicinininas, sugerindo que a liberação de neuropeptídeos esteja envolvida neste processo. Também foi observado que a aplicação tópica repetida de cinamaldeído 4 µg/orelha não foi capaz de induzir processos de sensibilização/dessensibilização. No entanto, o tratamento repetido com o antagonista TRPV1, capsaicina, aboliu o edema induzido pela própria capsaicina, confirmando a ocorrência de dessensibilização, e diminuiu parcialmente o edema induzido pelo cinamaldeído sugerindo o envolvimento de fibras sensíveis a capsaicina, além de outras vias, neste processo. Os resultados demonstram que o cinamaldeído induz um processo inflamatório na pele através de um mecanismo que envolve a ativação do receptor TRPA1 e consequente infiltração leucocitária.

**Palavras chave:** capsaicina, óleo de mostarda, TRP, edema

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Graduate Course in Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### THE INVOLVEMENT OF TRPA1 CHANNEL ACTIVATION IN THE INFLAMMATORY RESPONSE EVOKED BY TOPICAL APPLICATION OF CINNAMALDEHYDE TO MICE

Author: Cássia Regina da Silva  
Advisor: juliano ferreira  
Place and date: Santa Maria, March, 30<sup>th</sup>, 2011.

Cinnamaldehyde, a natural compound frequently present in cosmetic formulations, induces skin irritation when topically applied, but the mechanism by which cinnamaldehyde produces such skin reactions is unclear. Here, we showed that cinnamaldehyde induced ear edema in mice (1-6 µg/ear) with a maximum effect with 4 µg/ear ( $E_{max}$  of  $0.18 \pm 0.02$  mm and an  $ED_{50}$  value of 2.0 (1.1- 3.4 µg/ear). Cinnamaldehyde can induce leukocyte infiltration detected by an increase in MPO activity and confirmed by histological analyses. The edema and cellular infiltration evoked by 4 µg/ear of cinnamaldehyde was prevented through topical application of ruthenium red, a non selective TRP antagonist or by camphor and HC030031, two TRPA1 receptor antagonists. In contrast, the edema and the leukocyte infiltration was unaffected by the TRPV1 receptor antagonist SB366791. Cinnamaldehyde-induced edema but not cellular infiltration was also prevented though topical application of the tachykinin NK1 antagonist aprepitant, indicating a neuropeptides release phenomenon in this process. Also, we observed that repeated topical applications of cinnamaldehyde (4 µg/ear) did not induced sensitization/desensitization alterations. Interestingly, the TRPV1 antagonist, capsaicin, repeated treatment abrogated its edematogenic response, confirming the desensitization process and decrease partially the cinnamaldehyde induced edema, suggesting the involvement of capsaicin-sensitive fibers and additional targets in cinnamaldehyde response. The present results demonstrated that cinnamaldehyde induces mouse skin inflammation through a mechanism involved the TRPA1 receptor activation and subsequent leukocyte infiltration. In addition, evidence supports the assumption that the tachykinin NK1 receptor is involved in these inflammatory responses.

**Key words:** capsaicin, mustard oil, TRP, edema, skin irritation

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1</b> – Diversidade de neurônios somatosensoriais na pele .....	11
<b>Figura 2</b> – Liberação de neuropeptídeos (SP e CGRP) regulando o processo de inflamação neurogênica .....	13
<b>Figura 3</b> – Divisão das famílias de canais TRP.....	18
<b>Figura 4</b> – Canais TRP chamados termosensíveis.....	19
<b>Figura 5</b> – Reação de adição de Michael entre cinamaldeído e cisteína.....	21
<b>Figura 6</b> – Fórmula estrutural do cinamaldeído.....	24

### DISCUSSÃO

<b>Figura 7</b> - Ativação do receptor TRPA1 após aplicação tópica de cinamaldeído..	69
--	----

### MANUSCRITO

<b>Figura 1</b> – Ear edema induced by cinnamaldehyde and other TRP receptor agonists.....	54
<b>Figura 2</b> – Effect of TRP receptor antagonists on the edematogenic responses produced by cinnamaldehyde.....	55
<b>Figura 3</b> – Effect of TRP receptor antagonists on the edematogenic responses produced by allyl isothiocyanate or capsaicin.....	56
<b>Figura 4</b> – Effect of repeated topical application of cinnamaldehyde or capsaicin.	57
<b>Figura 5</b> – TRPA1 and TRPV1 expression.....	58
<b>Figura 6</b> – Myeloperoxidase activity following TRP activation.....	59
<b>Figura 7</b> – The representative light microphotograph of cinnamaldehyde-induced edema in mouse ear.....	60
<b>Figura 8</b> – Quantification of neutrophils per field by immunohistochemistry.....	61



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AITC</b>	Isotiocianato de Alila
<b>ANKTM1</b>	Proteína tipo anquirina com domínio transmembrana
<b>CGRP</b>	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>DCIP</b>	Dermatite de Contato com Irritante Primário
<b>DCA</b>	Dermatite de Contato Alérgica
<b>DRG</b>	Gânglio da Raiz Dorsal
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dose Efetiva 50%
<b>E<sub>máx</sub></b>	Efeito máximo
<b>GT</b>	Gânglio do Trigêmio
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NK<sub>1</sub></b>	Neurocinina 1
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RR</b>	Vermelho de Rutênio
<b>SP</b>	Substância P
<b>TRP</b>	Receptor de Potencial Transitório
<b>TRPC</b>	Receptor de Potencial Transitório Canônico
<b>TRPM</b>	Receptor de Potencial Transitório melastatina
<b>TRPML</b>	Receptor de Potencial Transitório mucolipina
<b>TRPN</b>	Receptor de Potencial Transitório sensível a estímulo mecânico
<b>TRPP</b>	Receptor de Potencial Transitório policistina
<b>TRPA</b>	Receptor de Potencial Transitório anquirina
<b>TRPV</b>	Receptor de Potencial Transitório vaniloide
<b>UV</b>	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
3.1. Objetivo Geral.....	8
3.2. Objetivos Específicos.....	8
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
4.1 Pele.....	10
4.2. Dermatite.....	14
4.3. Receptor de Potencial Transitório-TRP.....	16
4.4. Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1-TRPA1.....	19
4.5. Cinamaldeído.....	23
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>26</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

---

## **1. APRESENTAÇÃO**

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma revisão sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual encontra-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

---

## 2. INTRODUÇÃO

A dermatite de contato é uma das doenças de pele mais comuns, atingindo 10% da população mundial e tendo como característica primária o desenvolvimento de uma lesão avermelhada que pode apresentar prurido, e que se desenvolve após o contato da pele com uma substância química causadora (Kadyk et al., 2003; Slodownik et al., 2008). Por definição, esta reação da pele compreende manifestações agudas e crônicas devido a exposição a alérgenos (dermatite de contato alérgica) ou irritantes (dermatite de contato irritativa) (Fyhrquist-Vanni et al., 2007).

Vários compostos naturais podem induzir dermatite de contato devido à exposição da pele, como por exemplo, à produtos cosméticos que contenham estes ingredientes. Há estudos em animais e humanos demonstrando o poder irritante de diversos destes compostos, como por exemplo, o trans-cinamaldeído. O cinamaldeído confere sabor e cheiro característico à canela e é o principal componente encontrado no óleo de canela (para revisão, ler: Calixto et al., 2005). Ele é usado como fragrância em loções corporais, xampus, sabonetes e também em produtos não cosméticos como detergentes de limpeza (Bickers et al., 2005; Cocchiara et al., 2005).

É documentado que o uso do cinamaldeído em concentrações entre 0,125-1,25% não parece provocar reações na pele. No entanto, em uma concentração de 3% pode ser observada uma queimação local e em concentrações de 8% podem levar ao desenvolvimento de irritação severa da pele, evidenciada em voluntários humanos (Bickers et al., 2005; Cocchiara et al., 2005). Apesar disso, o cinamaldeído pode ser encontrado em concentrações de até 10% em alguns produtos cosméticos, como shampoos, cremes, desodorantes, entre outros. Porém o mecanismo pelo qual o cinamaldeído produz tais irritações ainda é desconhecido (Bickers et al., 2005; Cocchiara et al., 2005).

Recentemente foi demonstrado que o cinamaldeído e outros irritantes derivados de produtos naturais, como o isotiocianato de alila (AITC- substância encontrada na raiz forte e na mostarda) e a capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida- molécula ativa responsável pela ardência da pimenta vermelha), são agonistas de alguns membros da família TRP (Receptores de Potencial Transitório) de canais iônicos (Caterina et al., 1997; para revisão, ler: Calixto et al., 2005).

A família dos TRPs constitui-se de canais catiônicos não seletivos, formados por seis domínios transmembrana contendo suas porções amino e carboxi terminais

intracelularmente. Os TRPs são formados por seis subfamílias, das quais destacamos duas: TRPV (vanilóide) e TRPA (anquirina). Os receptores destas duas famílias em especial, podem ser ativados por uma ampla gama de estímulos nocivos como calor, frio, estimulação mecânica e várias substâncias químicas irritantes (Nilius et al., 2007).

O receptor TRPV1 é ativado por temperaturas  $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} < 5,9$ , e por várias substâncias exógenas irritantes como a capsaicina e resiníferatoxina (da planta *Euphorbia resinifera*), e por algumas substâncias endógenas, como a anandamida (para revisão, ler: Calixto et al., 2005). O receptor TRPA1 (único membro da subfamília TRPA em mamíferos) foi primeiramente descrito como sendo um sensor para o frio nocivo em terminações periféricas de fibras sensoriais, mas atualmente já existem estudos que contradizem tal afirmação (Story et al., 2003; Bautista et al., 2007). Além disso, o receptor TRPA1 é ativado por estímulos mecânicos e por várias substâncias naturais e irritantes derivadas de plantas como o isotiocianato de alila, a alicina (presente no alho) e o cinamaldeído (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Mapherson et al., 2005).

O canal TRPA1 pode ser encontrado nas terminações e nos corpos celulares de neurônios sensoriais co-localizados com o receptor TRPV1 e com neuropeptídeos como a substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A ativação destas terminações e consequente liberação de neuropeptídeos podem induzir sinais clássicos da inflamação, desencadeando o fenômeno conhecido como inflamação neurogênica. Este tipo de inflamação está envolvida no mecanismo de muitas doenças tais como a dor neuropática, a asma, a enxaqueca e a própria dermatite (Inoue et al., 1997; Peters et al., 2006). Esta inflamação na pele decorre de um fenômeno de vasodilatação arteriolar originado pelas fibras nervosas locais, com aumento do fluxo sanguíneo e consequente edema por extravasamento de plasma da vênula pós-capilar.

Uma observação interessante é o fato do cinamaldeído ser um agonista TRPA1, e o papel deste receptor na irritação da pele produzida por este ligante ainda é desconhecido. Thorne et al., 1991 demonstraram que o cinamaldeído quando aplicado topicamente na orelha de camundongos é capaz de induzir edema nas concentrações de 5, 10, 15 e 20%. Entretanto o efeito do cinamaldeído em outros parâmetros inflamatórios, como infiltração leucocitária, não é conhecido até o momento. Além disto, recentemente demonstrou-se que o TRPA1 pode ser

expresso em células não-neuronais, como nas principais células formadoras da epiderme, os queratinócitos (Atoyan et al., 2009). Assim, o objetivo do nosso estudo foi Investigar a participação do receptor TRPA1 na resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica de cinamaldeído na orelha de camundongos caracterizar melhor o processo inflamatório da pele, induzido pelo cinamaldeído.



---

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1 - Objetivo Geral**

Investigar a participação do receptor TRPA1 na resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica de cinamaldeído na orelha de camundongos.

### **3.2 - Objetivos Específicos**

- 1- Caracterizar o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de cinamaldeído;
- 2- Analisar a infiltração leucocitária induzida pela aplicação tópica de cinamaldeído por métodos enzimáticos, histológicos e imunohistoquímicos;
- 3- Verificar o efeito de antagonistas seletivos e não seletivos do receptor TRP e do receptor NK<sub>1</sub> sobre a resposta inflamatória induzida pelo cinamaldeído;
- 4- Verificar a ocorrência de sensibilização ou dessensibilização por aplicação repetida de cinamaldeído;
- 5- Verificar a expressão dos receptores TRPV1 e TRPA1 após sensibilização ou dessensibilização.

---

## **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

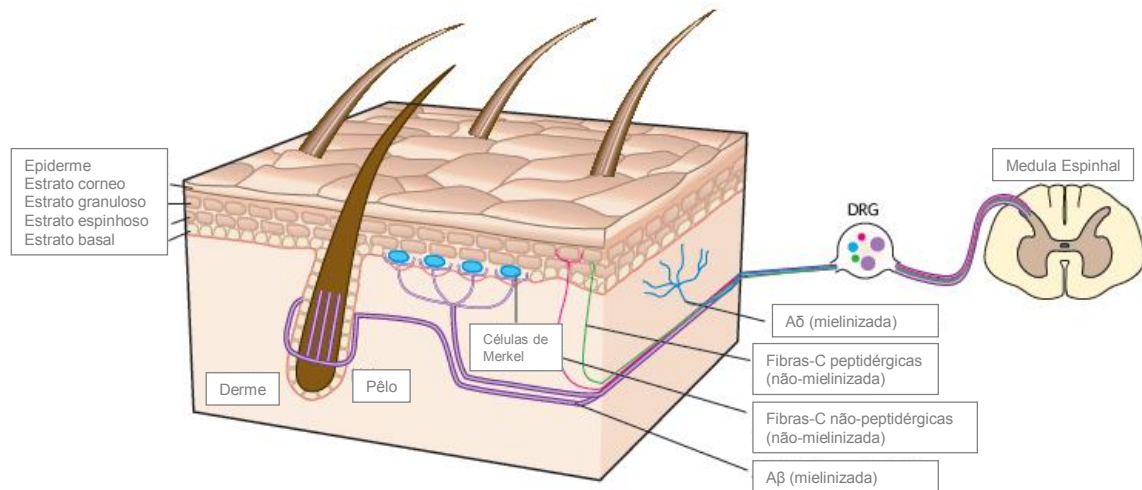
#### **4.1- Pele**

A pele é o revestimento externo do corpo, sendo um tecido imune e exercendo funções protetoras contra a exposição diária a diferentes danos, executando um grande número de funções críticas para a vida. Ela atua como uma barreira protetora contra a desidratação, estresses físicos e químicos e contra infecções. A pele também regula a temperatura corporal por controlar as ações de dilatação e contração dos vasos sanguíneos e glândulas sudoríparas. Ela funciona como um sítio de interação com vários tipos de estímulos que podem ser recebidos e processados pelo sistema nervoso central e periférico (Peters et al., 2006).

Os neurônios sensoriais que povoam a epiderme e a derme permitem detectar, avaliar e distinguir diferentes estímulos, sejam eles causados por organismos patogênicos, irradiação, agressão mecânica, alterações de temperatura ou agentes químicos (Steinhoff et al., 2003; Lee e Caterina 2005; Peters et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que esses neurônios cutâneos expressam numerosos canais iônicos, além de inúmeros receptores moleculares, os quais podem ser ativados por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos.

Os neurônios sensoriais cutâneos podem ser classificados como fibras-C, A $\beta$ - e A $\delta$ - se considerado seu grau de mielinização e velocidade de geração de potencial de ação (Figura 1) (Lumpkin e Caterina, 2007). Considerando-se critérios morfológicos, podem ser classificados em peptidérgicos (capazes de produzir e liberar neuropeptídeos como a substância P (SP) e o neuropeptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e não-peptidérgicos (Zegarska et al., 2006). Eles podem também ser classificados conforme a modalidade de estímulo sensorial que conduzem, por exemplo, os termoreceptores respondem a estímulos térmicos de calor ou frio enquanto que os mecanoreceptores respondem a estímulos mecânicos. Sensações de dor, temperatura ou formigamento podem também ser evocadas quando substâncias químicas exógenas ou endógenas ativam seus sítios de ação presentes nos neurônios sensoriais cutâneos (para revisão, ler: Calixto et al., 2005; Lumpkin e Caterina, 2007). A estimulação dos receptores presentes nos neurônios peptidérgicos pode promover uma rápida liberação de neuropeptídeos nas terminações nervosas sensoriais. Estes neuropeptídeos podem estar envolvidos na regulação da função de arteríolas e vênulas ou ainda de glândulas (Stenhoff et al.,

2003; Peter set al., 2006; Zegarska et al., 2006). Estudos recentes demonstram que esses neuropeptídeos podem ser regulados por células não-neuronais como os queratinócitos (Atoyán et al., 2009; Denda et al., 2001).



**Figura 1.** Diversidade de neurônios somatossensoriais na pele. A pele é innervada por neurônios sensoriais que se projetam até a medula espinhal. Fibras Aβ, como aquelas que innervam as células de Merkel e se localizam em torno da base do pêlo, são sensíveis ao toque. Fibras Aδ- e fibras C incluem nociceptores e termoreceptores. Fibras-Aδ possuem terminações livres na derme. Fibras C não peptidérgicas e peptidérgicas terminam em diferentes camadas epidérmicas e apresentam diferentes projeções na medula espinhal. Adaptado de Lumpkin e Caterina, 2007.

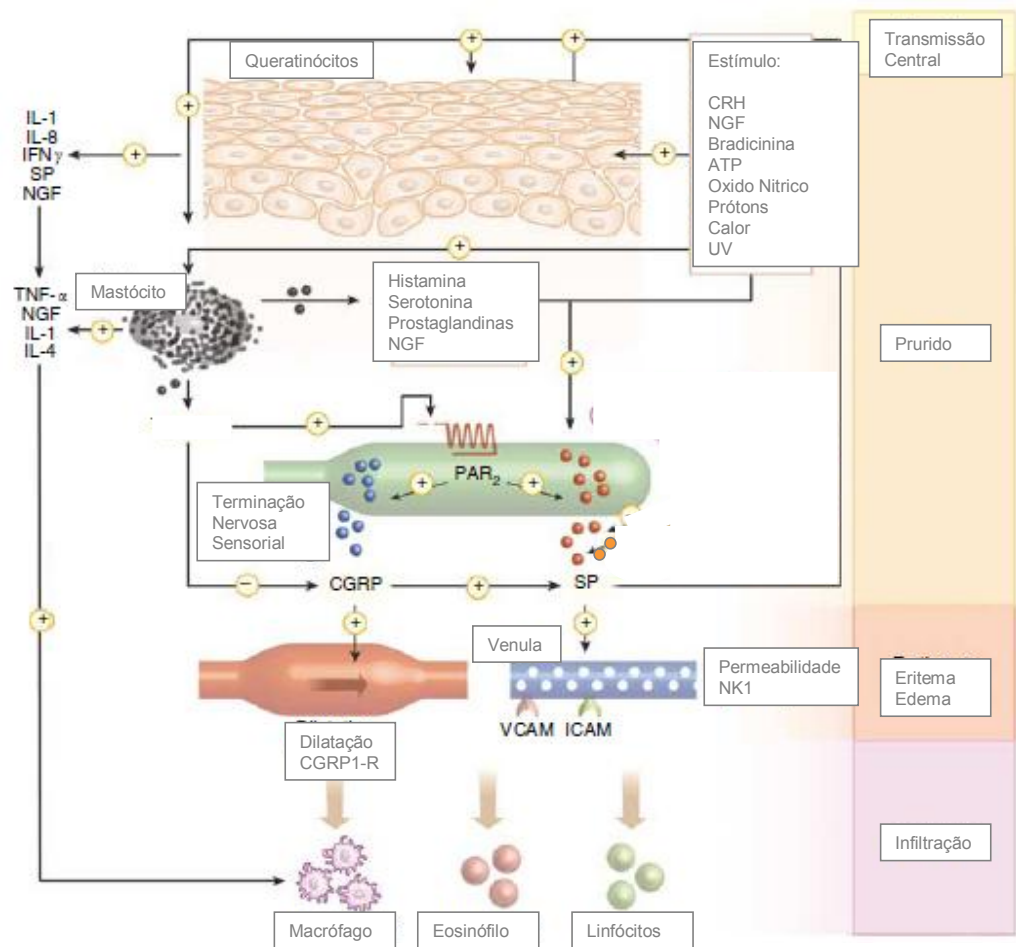
Os queratinócitos representam o tipo celular predominante na epiderme, originando-se da camada basal e formando um epitélio estratificado bem organizado. Há estudos que demonstram que os queratinócitos expressam alguns receptores, entre eles os receptores de potencial transitório (TRPs) que quando ativados estão envolvidos em uma gama de processos que vão desde a proliferação dos próprios queratinócitos, apoptose de algumas células da pele até a percepção

de estímulos térmicos, físicos e químicos (Peter et al., 2006; Biró e Kóvacs, 2009; Atoyán et al., 2009). A ativação dos receptores TRP vaniloide tipo 1 (TRPV1) e TRP anquirina tipo 1 (TRPA1), em especial, pode ainda envolver outros processos como a regulação de eventos pro - inflamatórios (Gábor et al., 1992; Inoue et al., 1997).

Neste sentido, estudos demonstram que os queratinócitos expressam receptores para neurocininas NK<sub>1</sub> (receptores para a substância P) e para CGRP (receptores para peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), que são os dois principais neuropeptídeos liberados durante o processo de inflamação neurogênica (Figura 2) (Scholzen et al., 1998; Peter et al., 2006).

Na pele, esta inflamação é iniciada ou mantida com a liberação desses neuropeptídeos após, por exemplo, a ativação de receptores TRP nos queratinócitos ou terminações nervosas sensoriais, causada por diversos estímulos como radiação UV, temperaturas extremas, substâncias irritantes, entre outros (Peters et al., 2005). Ainda, a regulação destes neuropeptídeos pode se dar através de degranulação mastocitária. Após a liberação dos neuropeptídeos pode ocorrer respostas vasculares que incluem extravasamento plasmático e recrutamento de algumas citocinas que vão coordenar a infiltração leucocitária, causando prurido, edema, vermelhidão e infiltração celular cutânea (Peters et al., 2006).

Por este motivo, durante algumas doenças de pele, como por exemplo nas dermatites, a inervação cutânea se apresenta alterada e vários fatores, como o estresse, podem exacerbar este fenômeno inflamatório. Acredita-se que nesses casos ocorra um aumento da liberação de neuropeptídeos que encontram nos queratinócitos receptores funcionais, alvos para sua sinalização (Peters et al., 2005).



**Figura 2.** Liberação de neuropeptídeos (SP e CGRP) regulando o processo de inflamação neurogênica. Diferentes estímulos como calor, prótons, bradicinina, irritantes, entre outros; podem ativar determinados receptores presentes em terminações nervosas sensoriais ou células da pele como os queratinócitos. SP e CGRP liberados de terminações nervosas sensoriais levam a degranulação mastocitária e regulam o fluxo sanguíneo, ocorre dilatação arteriolar e vasodilatação venular, com conseqüente extravasamento plasmático e edema. Algumas citocinas e interleucinas são recrutadas diretamente nos queratinócitos ou pela degranulação de mastócitos iniciando infiltração celular. Outros mediadores como histamina, serotonina ou prostaglandinas, atuam neste processo por regulação direta da liberação de neuropeptídeos como SP e CGRP. Adaptado de Peter set al., 2006. Abreviações: ATP- Trifosfato de adenosina; CGRP- Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina; CGRP1- Receptor para CGRP tipo 1; CRH- Hormônio liberador de Corticotrofina; ICAM- Molécula de Adesão Intercelular; IFN- Interferon; IL- Interleucina; NGF- Fator de Crescimento do Nervo; PAR- Receptor de Proteinase Ativado; SP- Substância P; NK<sub>1</sub>- Receptores para SP; TNF- Fator de Necrose Tumoral; UV- Luz Ultravioleta; VCAM- Molécula de Adesão Celular Vascular.

## **4.2 - Dermatite**

A dermatite pode ser definida como um grupo de doenças inflamatórias da pele, pruriginosas, com características clínicas e histológicas comuns e muito bem definidas (Azulay, 2008). As lesões elementares que definem as dermatites são: eritema, edema, vesículas, crostas e descamação. De acordo com a predominância destas lesões, o quadro pode ser classificado em agudo, subagudo e crônico (Azulay, 2008).

As dermatites podem ser classificadas de acordo com o agente causador e a forma como se iniciam em dermatite atópica, dermatite de contato, seborréica, numular, neurodermatite, de estase e disidrótica. Elas resultam de causas externas com etiologia variada e mecanismos patogênicos diversos, acometem igualmente ambos os sexos e podem ocorrer em qualquer época da vida sendo uma das causas mais comuns de faltas no trabalho. São de ocorrência muito freqüente sendo mais comum a dermatite de contato, seguida da dermatite atópica e da seborréica (Azulay, 2008). Existem variações na suscetibilidade dos indivíduos e de regiões do mesmo indivíduo que dependem, principalmente, da espessura da camada córnea. Ainda, o tipo constitucional da pele, pigmentação, pH e manto lipídico são condições que, alteradas, podem favorecer o aparecimento de dermatoses ocupacionais.

No tratamento, a primeira providência é afastar o agente causal e priorizar o tratamento de infecções secundárias eventuais. Não há cura, apenas controle da doença. O tratamento inclui remoção do agente agressor em conjunto com a utilização de cremes antiinflamatórios esteróides, anti-histamínicos e, nos casos severos, corticóides orais (Fyhrquist et al., 2007). Nas dermatites de contato costumam-se aplicar testes de contato, que são úteis na identificação de substâncias as quais o indivíduo é alérgico. Entretanto, os resultados devem ser interpretados com critério, pois as substâncias testadas, ainda que positivas, podem não estar envolvidas no problema atual.

Podemos distinguir dois tipos de dermatite de contato, com etiologia e fisiopatogenia distintas: dermatite de contato por irritante primário (DCIP) e dermatite de contato alérgica (DCA). Tanto a DCIP quanto DCA podem ser de causa ocupacional. A DCIP é provocada, em geral, por substâncias alcalinas ou ácidas



fracas que, não tendo a capacidade de provocar queimaduras ou necrose, apenas produzem irritação cutânea. Estas substâncias ao entrarem em contato com a pele, causam lesão dos queratinócitos, surgindo, posteriormente, reação inflamatória da derme papilar. Os sintomas clínicos se apresentam como eritema, descamação e por vezes, vesículas e bolhas, surgindo horas após o contato com irritantes fortes como alguns ácidos (manifestação aguda), ou depois de semanas de uso continuado com irritantes mais fracos, como sabonetes e xampus (manifestação crônica). As duas principais variáveis são as concentrações da substância e o tempo de exposição. O diagnóstico é sugerido pela localização da erupção e história de exposição ao agente agressor (Peters et al., 2006; Fyhrquist et al., 2007; Azulay et al. 2008).

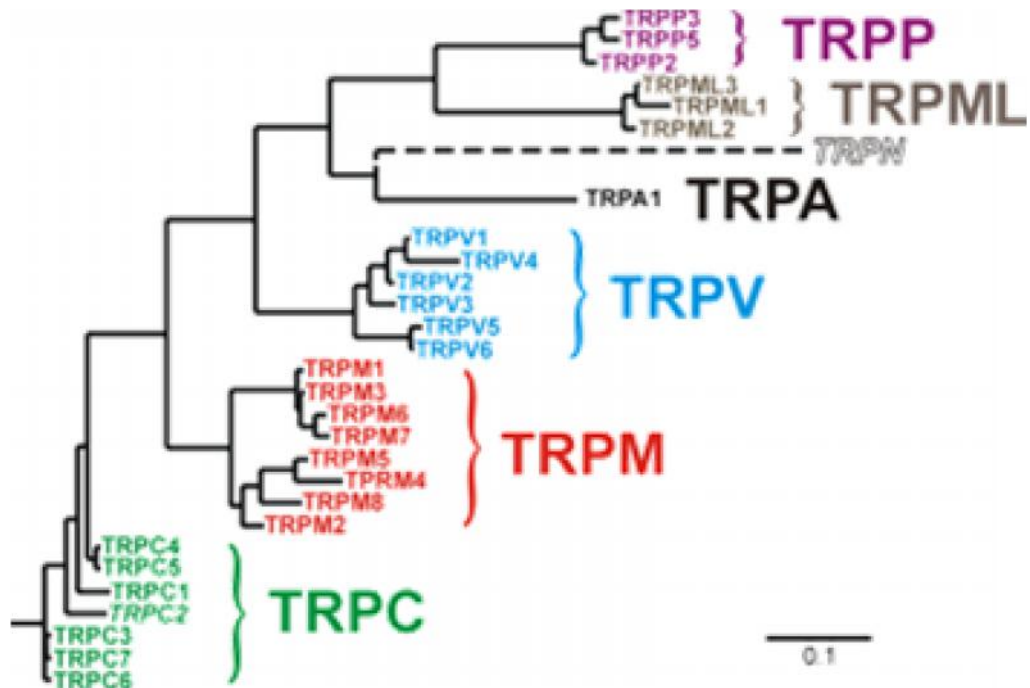
A DCA é aquela decorrente da resposta ao contato com substâncias que provocam alergia, ocorrendo em poucos dias com alérgenos com alto poder sensibilizante (7 a 14 dias), podendo levar anos para ocorrer com outros antígenos. Assim como na DCIP, os agentes etiológicos da DCA são substâncias químicas pouco complexas como elementos ou compostos minerais ou orgânicos e haptenos. Porém determinadas substâncias são especialmente sensibilizantes como, por exemplo, metais, antibióticos e cosméticos. Clinicamente a DCA pode apresentar-se de três formas, sempre com muito prurido: aguda (eritema, vesículas, exsudação e crostas); subaguda (pápulas) e crônica (liquenificação) (Azulay et al. 2008; Fyhrquist et al., 2007).

As respostas inflamatórias ocorridas durante a DCPI e a DCA são parecidas e incluem também infiltração leucocitária na derme e epiderme, que aparece já no segundo dia da irritação. Esse infiltrado pode ser responsável pela iniciação e manutenção de sintomas como calor, edema e até bolhas (Fyhrquist-Vanni et al., 2007). Outro componente importante desta doença de pele é a liberação de neuropeptídeos, envolvida na indução ou manutenção da doença, exacerbando as respostas inflamatórias ocorridas na dermatite. Grant et al. (2005) demonstraram que camundongos com supressão do receptor  $NK_1$  (receptor para substância P) expostos à aplicação tópica de isotiocianato de alila (ativador TRPA1) como modelo de DCA, apresentaram redução da resposta inflamatória em comparação aos animais normais, confirmando a importância da via de sinalização dos neuropeptídeos, como SP, nessa doença (Peter set al., 2005; Grant et al., 2005).

### 4.3 – Receptor de Potencial Transitório – TRP

Os canais TRP começaram a chamar a atenção na década de 60, com os estudos de Cosens e Manning que em 1969 descreveram pela primeira vez uma mutante da *Drosophila melanogaster* que apresentava uma resposta transitória sustentada em resposta à estimulação luminosa prolongada, ao passo que o normal seria uma resposta contínua. Vinte anos após essa descoberta, Montell e Rubin (1989) descreveram o primeiro canal TRP da *Drosophila*.

Os primeiros membros identificados da superfamília TRP foram referidos como “clássicos” ou “canônicos” (TRPC) e compõem a família que exibe a maior homologia aos canais TRP presentes na *Drosophila*. O primeiro membro da superfamília TRP a ser clonado foi o TPC1, em 1995, por Wess et al. A partir desses estudos impulsionou-se a procura por outras proteínas e canais homólogos aos TRP. Até hoje foram descritos 85 canais TRP (presentes em vertebrados e invertebrados) organizados em sete famílias (Figura 3) conforme sua homologia na seqüência de aminoácidos, sendo denominadas de TRPC (canônico), TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPA (anquirina), TRPML (mucolipina), TRPN (não sensível a estímulo mecânico) e TRPP (policistina). Cada uma destas famílias é representada por pelo menos um membro TRP da *Drosophila*, sugerindo a existência de um importante componente evolucionário (Pedersen et al., 2005; Niulus et al., 2007; Latorre et al., 2009).

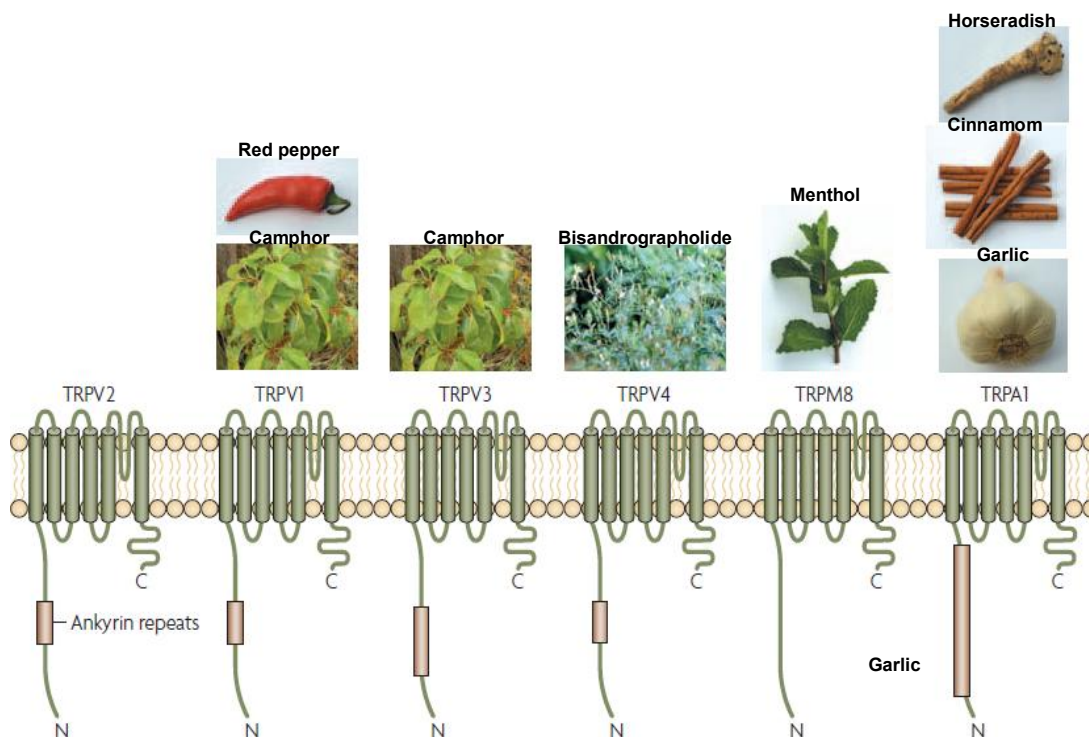


**Figura 3.** Divisão das famílias dos canais TRP. A superfamília TRP é dividida em sete famílias conforme a homologia em sua cadeia de aminoácidos. A família TRPC (canônico) é a que possui maior similaridade com o gene TRP da *Drosophila*, seguida da família TRPM (melastatina), TRPV (vanilóide), TRPA (anquirina), TRPN (não sensível a estímulo mecânico), TRPML (mucopolipina) e TRPP (policistina). Adaptado de Nilius et al., 2005.

Os canais TRP são canais catiônicos não seletivos formados por seis domínios transmembrana (S1-S6), com a região formadora do poro entre as regiões S5 e S6, e a região sensor de voltagem entre as regiões S1 e S4 (Latorre et al., 2009). A cauda C e N terminal apresentam-se voltadas para o lado intracelular, com caráter fortemente hidrofóbico (Gaubet et al., 2009). A região C terminal varia nos diferentes canais TRP, apresentando diferentes sítios e também uma região conservada (domínio TRP ou TRP box). Acredita-se também que estes canais possam se apresentar como homômeros tetraméricos (Strübing et al., 2001).

A região N terminal é formada por uma seqüência de resíduos anquirina, presente na maioria dos canais TRP. Estes resíduos formam uma estrutura passível da ligação de diversas proteínas ao receptor. Ainda, estes resíduos servem como âncora para o trânsito do receptor, da vesícula sináptica até a membrana plasmática (Latorre et al., 2009).

A maioria dos TRPs pode ser ativada por uma grande gama de diferentes estímulos, incluindo mensageiros intra- e extracelulares, estímulos térmicos, químicos (variação de pH e osmolaridade), sonoros e luminosos (Pedersen et al., 2005; Nilius et al., 2005). Outra característica interessante é sua capacidade de sofrer ativação por substâncias naturais, especialmente aquelas derivadas de plantas (Figura 4). Atualmente se conhecem várias substâncias derivadas de plantas que são capazes de ativar o canal TRPV1, como o eugenol, a zingerona, a piperina, o gingerol entre outros. Outros dois canais TRP bastante regulados por substâncias naturais são o canal TRPM8, ativado pelo linalol, geraniol, mentol, eucaliptol, entre outros; e o TRPA1 que pode ser ativado pelo alil isotiocianato,  $\Delta^9$ -tetraidrocanabinol, cinamaldeído, entre outros (para revisão ver: Calixto et al., 2005; para revisão ver: Appendino et al., 2008).



**Figura 4.** Canais TRP chamados termosensíveis. Os receptores TRPV2, TRPV1, TRPV3 e TRPV4 (da subfamília vaniloide); TRPM8 (da subfamília melastatina) e TRPA1 (da subfamília anquirina) parecem ser ativados por diferentes temperaturas e por diferentes compostos naturais, conforme mostra a figura. Todos apresentam sete domínios transmembrana e na porção N intracelular é possível observar a presença de resíduos de anquirina, com exceção do TRPM8. Adaptado de Szallasi et al., 2007.

Os canais TRP sensíveis à temperatura desempenham um papel importante na biologia funcional da pele. Eles podem estar expressos em neurônios sensoriais ou em células não neuronais da pele como nos queratinócitos, agindo desde o controle da diferenciação celular e respostas inflamatórias da pele até o crescimento dos pêlos (Biró et al., 2007).

#### **4.4- Receptor de Potencial Transitório anquirina 1 - TRPA1**

Este canal foi primeiramente isolado em 1999, na busca por proteínas sensíveis a alterações em cultura de fibroblastos (Jaquemar et al., 1999). Tal proteína foi então denominada p120, com o gene correspondente identificado no cromossomo 8 de humanos capaz de codificar uma proteína de 1119 aminoácidos formando dois domínios distintos, com uma seqüência similar a outras proteínas pertencentes a família de canais TRP (Jaquemar et al., 1999).

Quatro anos após esta identificação, Story et al. (2003) caracterizaram a proteína tipo anquirina com domínios transmembrana (ANKTM1). Eles buscaram por seqüências de cDNA contendo seis domínios transmembrana e resíduos de anquirina repetidas na região N terminal, características comuns em TRPs. Usando técnicas de PCR- transcriptase reversa em gânglio da raiz dorsal (DRG) e do gânglio trigeminal (GT) de camundongos, Story et al clonaram o canal TRPA1 e propuseram um receptor com 14 proteínas do tipo anquirina repetidos na porção N terminal seguida de seis domínios transmembrana.

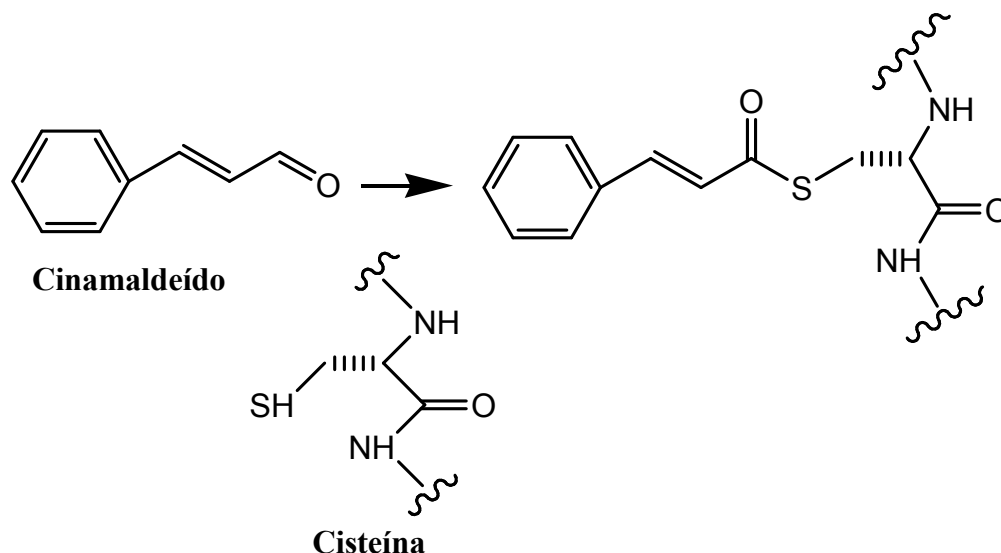
Este canal foi denominado ANKTM1, e os estudos sugeriram se tratar de um receptor sensível ao frio nocivo (Story et al., 2003). Atualmente se tem certo cuidado ao afirmar que o TRPA1 é um canal ativado pelo frio ( $\leq 17^{\circ}\text{C}$ ). Quando expresso em sistemas heterólogos ele é passível desta ativação, porém o papel do frio na ativação de receptores TRPA1 expressos em neurônios sensoriais periféricos ainda é incerto (Karashima et al., 2009; Caspani e Paul, 2009; Dunham et al., 2010).

O receptor TRPA1, assim como outros TRPs, é um canal catiônico não seletivo permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ , com seis segmentos transmembrana, com poro entre os segmentos S5 e S6 e porção  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  terminais localizadas intracelularmente. Apresenta 14 repetições semelhantes as da proteína anquirina na porção amino

terminal, de onde deriva seu nome (Lee et al., 2006). Ao passo que outros animais expressam dois ou mais genes TRPA, em mamíferos o TRPA1 é o único membro dessa subfamília. É expresso em diferentes tecidos como nos gânglios sensoriais (DRG, TG e vagal) e fibras sensoriais do tipo C e A $\delta$ , onde sua ativação é capaz de produzir dor aguda e inflamatória pela liberação de neuropeptídeos como SP e CGRP (Szallasi e Blumberg, 1999; Story et al., 2003; Bandell et al., 2004; Nagata et al., 2005). Também é encontrado fora do SNC em tecidos não neuronais como no folículo capilar, algumas áreas do intestino, músculo esquelético, coração, cérebro e componentes do sistema imune onde parece agir como um canal sensível a estímulos mecânicos (Corey et al., 2004; Stokes et al., 2006; Karashima et al., 2009). Pode ser expresso ainda no sistema nervoso periférico cutâneo e em células não neuronais da pele como os queratinócitos, onde parece estar envolvido com o controle de algumas funções regulatórias da pele, podendo também iniciar processos inflamatórios pela liberação de neuropeptídeos como a SP e o CGRP (Denda et al., 2009; Atoyan et al., 2009).

Fisiologicamente, este receptor é responsável pelo reconhecimento de vários estímulos nocivos e mecânicos (Jordt et al., 2004; Caspani et al., 2008). O receptor TRPA1 também pode ser ativado por diferentes substâncias derivadas de produtos naturais. Esta característica é importante do ponto de vista farmacológico, permitindo a divisão destes compostos em duas classes, a primeira (geralmente ativadores mais potentes) é caracterizada pela presença de um carbono eletrofílico ou átomo de enxofre que será objeto de ataque por grupos nucleofílicos do receptor. Por exemplo, o cinamaldeído, extraído do óleo da canela, pode sofrer ataque em sua ligação  $\alpha\beta$ -insaturada por parte de um átomo de enxofre ligado a um resíduo de cisteína (Figura 5). Assim, estes ligantes estabelecem uma modificação covalente nos resíduos de cisteína localizados na porção NH<sub>2</sub>-terminal citoplasmática do receptor (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007). Por isso é importante que esses compostos possuam alta lipofilicidade para atravessar a membrana plasmática e interagir com o sítio intracelular. Acredita-se que este também seja o mecanismo pelo qual o canal é ativado por espécies carbonílicas reativas endógenas como o 4-hidroxi-2-nonenal (Trevisani et al., 2007). Foram identificados três diferentes resíduos de cisteína como sendo fundamentais para a ligação dos compostos por este mecanismo. Os resíduos C619, C639 e C663 em humanos e

C415, C422 e C622 em ratos, sendo que apenas um destes resíduos é comum para ambas as espécies, o resíduo C619 de humanos que equivale ao C622 de ratos



**Figura 5.** Representação da reação entre o carbono eletrofílico do cinamaldeído e o átomo de enxofre da cisteína. Após ataque nucleofílico por parte da cisteína ocorre uma modificação covalente na porção NH<sub>2</sub>-terminal intracelular do canal, característica de sua ativação.

A segunda classe de compostos naturais faz a ativação através da interação direta com o receptor via interação reversível e temporária pelo modelo proposto por Fischer de chave e fechadura (referencia). Parece ainda haver um fator citosólico solúvel envolvido na facilitação da ativação TRPA1 por ligantes endógenos e exógenos. Porém, mais estudos ainda são necessários para o completo entendimento a cerca do mecanismo pelo qual o receptor é ativado ou inativado por diferentes ligantes (Fajardo et al., 2008; Baraldi et al., 2010).

Alguns exemplos de compostos naturais capazes de ativar o canal TRPA1 são: cinamaldeído (encontrado na casca e folhas da canela), alil isotiocianato (componente responsável pela pungência do óleo de mostarda), dialil dissulfato e alicina (presentes no alho), wasabi (tempero utilizado na culinária japonesa, feito da raiz forte), acroleína (presente na fumaça do cigarro) e  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinol (composto psicoativo da marijuana) (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Macpherson et al., 2005; André et al., 2008). O TRPA1 pode sofrer ativação por

parte de alguns gases voláteis, o que varia de acordo com sua pungência (desflurano  $\geq$  isoflurano  $\gg$  sevoflurano / halotano) (Matta et al., 2007). Ainda, pode sofrer ativação indireta por peptídeos inflamatórios como a bradicinina (Bandel et al., 2004).

Outra classe de substâncias que agem no receptor TRPA1 são os chamados antagonistas do canal, que impedem a sua ativação, como a cânfora (isolada da planta *Cinnamomum camphora*), mecamilamida, compostos tricloro etilbenzamidas, derivados de ftalimida entre outros (Baraldi et al., 2010).

Outra característica importante dos canais TRP é que estes podem sofrer processos de sensibilização e dessensibilização frente a diversos estímulos químicos e nocivos, que são mecanismos utilizados na regulação funcional dos neurônios sensoriais e no processamento nociceptivo (Akopyan et al., 2007; Ruparel et al., 2008). Há estudos que sugerem que o receptor TRPA1 possa sofrer dessensibilização homóloga após a aplicação repetida de agonistas como o cinamaldeído, ou ainda uma dessensibilização cruzada, induzida por capsaicina (agonista TRPV1), uma vez que a expressão dos receptores TRPA1 está amplamente ligada a neurônios sensoriais que também expressam TRPV1 (Ruparel et al., 2008). Há uma segunda linha de estudos demonstrando que pode ocorrer sensibilização desse canal após sua ativação e uma terceira linha que não encontra alteração na resposta do receptor após tratamento repetido ou após a aplicação de grandes doses de agonistas TRPA1 (Inoue et al., 1997; Dunham et al., 2008; Smidt et al., 2009; Karashima et al 2008). A diferença entre os achados pode ser atribuída ao protocolo experimental utilizado, como o tempo de exposição ao agonista, o número de aplicações, o intervalo entre as aplicações, a concentração do agonista e ainda se o experimento foi realizado em cultura de células ou *in vivo*.



#### 4.5 – Cinamaldeído

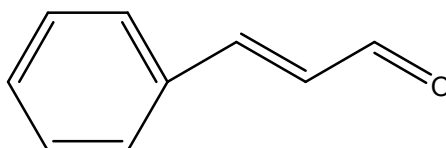
O óleo de canela é o óleo essencial obtido das folhas e da casca da *Cinnamomum cassia* ou da casca do *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae). Contem não menos de 60% de aldeídos totais. É relatado que o óleo de canela possui propriedades anti-espasmódica, carminativa, antimicrobiana, e refrescante (ver revisão: Calixto et al., 2005).

O cinamaldeído (Figura 6) é o maior constituinte extraído do óleo da canela (70%) e é usado como ingrediente em muitas fragrâncias. Foi produzido pela primeira vez em 1884, pelos químicos franceses Eugène Péligot e Jean-Baptiste Dumas. Pode ser encontrado em cosméticos decorativos, fragrâncias finas, xampus, sabões, desodorantes, assim como em produtos não-cosméticos tais como líquidos de limpeza e detergentes. Seu uso a nível mundial é de 100-1000 toneladas por ano (Cochiara et al., 2005). Apresenta-se como um líquido de coloração amarela, mais viscoso que a água e cheirando intensamente a canela. A maior parte é excretada na urina sob a forma de ácido cinâmico (a forma oxidada do cinamaldeído). Como hidrocarboneto aromático e aldeído, tem um anel benzênico monosubstituído. A ligação dupla conjugada torna a geometria do composto planar. Tecnicamente considera-se o cinamaldeído como trans – cinamaldeído porque o grupo carbonila terminal se opõe ao anel aromático na ligação dupla rígida. O isolamento deste composto da sua fonte natural pode ser efetuado recorrendo à técnica de destilação por vácuo visto que o seu ponto de ebulição é de 250°C nas condições normais de pressão.

O cinamaldeído concentrado é um irritante para a pele sendo tóxico em doses elevadas. A dose letal quando administrado por via oral em ratos é de 2,2g/Kg; por via intraperitoneal em camundongos é de 460mg/Kg e por aplicação cutânea em coelhos é de 10g/Kg (Cochiara et al., 2005).

Um caso bem comum de dermatite causada pelo uso repetido de uma formulação contendo cinamaldeído é o uso diário de desodorantes que contenham este composto. O cinamaldeído é capaz de produzir reações de irritação da pele quando usado nas concentrações de 3%, sendo que 12/20 voluntários com hipersensibilidade ao produto desenvolvem dermatite axilar com o uso diário, duas vezes ao dia, de desodorantes com concentrações de 0,01% a 0,3% (Bruze et al.,

2003; Bickers et al., 2005). Estudos sobre absorção *per* cutânea do cinamaldeído realizados na pele do abdômen de voluntários humanos demonstram que cerca de 55% do cinamaldeído penetra na pele (Cocchiara et al., 2005; Bickers et al., 2005).



**Figura 6.** Fórmula estrutural do cinamaldeído. Aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administration); pelo FEMA (Flavor and Extract Manufacturers), pelo Concil of Europe, com registro no ICCA (International Council of Chemical Associations) e com registro a partir de 2003 no IFRA (Fragrances International Association).

De acordo com a indústria responsável pela comercialização de fragrâncias, a concentração máxima encontrada de cinamaldeído é em perfumes (8%). Em cremes e loções pode ser encontrado na concentração máxima de 0,02%. Ainda, um estudo que pesquisou entre a formulação de 73 desodorantes a presença de 21 diferentes fragrâncias demonstrou que o cinamaldeído estava presente em 17% das formulações em concentrações que variavam de 0,0001-0,0424%, sendo que a concentração máxima recomendada é de 0,01%, uma vez que é um produto de uso diário (Bruze et al., 2003). É importante observar que devem ser levados em conta fatores como o tempo e a quantidade de exposições, intervalo entre as exposições, forma farmacêutica onde o composto é encontrado e a concentração do mesmo para se determinar as condições seguras de uso (referencia).

Atualmente, sabe-se que o cinamaldeído é o agonista TRPA1 mais seletivo desse receptor (Bandel et al., 2004). Entretanto, não se exclui o fato do cinamaldeído ativar outros canais iônicos que não o TRPA1, por exemplo, ele é capaz de ativar o canal TRPV3 (5 mM) e inibir o canal TRPM8 (1,5 mM), porém estes efeitos ocorrem em concentrações bem maiores que a necessária para a ativação do TRPA1 (9,5 µM) (Macpherson et al., 2006). Outra possibilidade é que o

cinamaldeído exerça seus efeitos através da formação de um conjugado com grupos nucleofílicos de proteínas da pele (Weibel et al., 1989). Thorne et al. (1991) demonstraram que após aplicação tópica de cinamaldeído ocorre edema. Porém ainda não há estudos demonstrando se outros parâmetros inflamatórios ocorrem quando o cinamaldeído é aplicado topicamente nem o papel do receptor TRPA1 no efeito pro- inflamatório induzido pelo cinamaldeído.



**The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice**

Cássia Regina Silva<sup>1</sup>, Sara Marchesan Oliveira<sup>1</sup>, Mateus Fortes Rossato<sup>1</sup>, Gerusa Duarte Dalmolin<sup>2</sup>, Gustavo Petri Guerra<sup>1</sup>, Arthur da Silveira Prudente<sup>3</sup>, Daniela Almeida Cabrini<sup>3</sup>, Michel Fleith Otuki<sup>4</sup>, Eunice André<sup>5</sup>, Juliano Ferreira<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil

<sup>5</sup>Departamento de Biofísica e Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

\*Corresponding author: Juliano Ferreira, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. Phone: +55 (55) 32208053; Fax: +55 (55) 32208031.

e-mail: ferreira99@gmail.com

Abstract

**Aims:** In the present work, we characterize the inflammatory process induced by the topical application of cinnamaldehyde on the skin of mice and verify the participation of transient receptor potential A1 TRPA1 receptors in this process.

**Main methods:** We measured mouse ear edema and sensitization/desensitization after topical application of cinnamaldehyde or/and capsaicin. We also quantified cellular infiltration through myeloperoxidase (MPO) activity and histological and immunohistochemical analyses and evaluated the expression of TRPV1 and TRPA1 by western blot.

**Key findings:** Cinnamaldehyde induced ear edema in mice (1-6  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) with a maximum effect of 4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ . Cinnamaldehyde promoted leukocyte infiltration as detected by increasing MPO activity and confirmed by histological analyses. The edema and cellular infiltration evoked by the application of 4  $\mu\text{g}/\text{ear}$  of cinnamaldehyde were prevented by topical application of ruthenium red, a non-selective TRP antagonist as well as camphor and HC030031, two TRPA1 receptor antagonists. Cinnamaldehyde-induced edema, but not cellular infiltration, was prevented by topical application of the tachykinin NK1 antagonist, aprepitant, indicating a neuropeptide release phenomenon in this process. Additionally, we observed that repeated topical applications of cinnamaldehyde did not induce changes in sensitization or desensitization with respect to the edema response. Interestingly, repeated treatment with the TRPV1 agonist, capsaicin, abrogated its edematogenic response, confirming the desensitization process and partially decreasing the cinnamaldehyde-induced edema, suggesting the involvement of capsaicin-sensitive fibers.

**Significance:** Our data demonstrate that the topical application of cinnamaldehyde produces an inflammatory response that is dependent on TRPA1 receptor stimulation.

**Key words:** capsaicin, mustard oil, TRP, edema, skin irritation

## **Introduction**

Various natural compounds can induce contact irritant dermatitis upon skin exposure. Commonly used products such as cosmetics may contain these ingredients. Animal and human studies have demonstrated the irritant properties of several compounds, such as cinnamaldehyde, which is found in cinnamon oil and used in body lotions, hair sprays, shampoos and face creams (Cocchiara et al. 2005). Cinnamaldehyde is considered a moderately potent sensitizing hapten that is capable of penetrating the skin, and the use of up to 3% cinnamaldehyde can induce dermal irritation in human volunteers. In spite of this, 10% cinnamaldehyde can be found in some cosmetic products. However, the mechanism by which this irritant compound produces skin reactions is still unclear (Johansen et al. 1996; Bickers et al. 2005; Thorne et al. 1991).

Other natural skin irritants, such as allyl isothiocyanate from mustard oil and capsaicin from red pepper, produce dermatitis by stimulating members of the transient receptor potential (TRP) family of ion channels. TRP channels are widely expressed in mammalian tissues and play diverse roles in sensorial detection. These channels involve six related protein subfamilies that comprise the TRPV1 (vanilloid subfamily) and the TRPA1 (ankyrin subfamily) receptors, which are gated by diverse stimuli, such as chemical and thermal activation (Caterina et al. 1997; Story et al. 2003; Bandell et al. 2004; for review see: Calixto et al. 2005).

TRPV1, a heat-activated channel ( $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ), is stimulated by a broad array of natural, synthetic and endogenous substances, such as capsaicin, resiniferatoxin and anandamide. It has been hypothesized that TRPA1 could be activated by mechanical and cold stimuli, but this is still under debate (Corey et al., 2004; Bandell et al., 2004; Kwan et al., 2006; Jordt et al., 2004; Caspani et al., 2008). Also, TRPA1 is chemically

activated by a wide range of natural and synthetic compounds, including endogenous ligands (4-hydroxynonenal), and several irritant substances (allyl isothiocyanate and cinnamaldehyde) (Trevisani et al. 2007; Bautista et al. 2005; for review see: Calixto et al. 2005; Zurborg et al., 2007). Allyl isothiocyanate and capsaicin have been historically used as chemical irritants in models of ear edema in rodents. Their application results in characteristic neurogenic inflammation, which is observed as increased blood flow, vascular permeability, leukocyte infiltration and release of neuropeptides into the rodent skin, a phenomenon that is also observed in some cases of dermatitis (Jancsó et al. 1977; Gamse et al. 1980; Gábor and Razga 1992; Inoue et al. 1997; Huang et al. 2003).

Cinnamaldehyde may induce ear edema in mice (Thorne et al. 1991), however, the effect of cinnamaldehyde on other inflammatory parameters, such as leukocyte infiltration, is unclear. Despite knowing that cinnamaldehyde acts as an agonist of TRPA1, the role of TRPA1 in skin irritation produced by cinnamaldehyde is still unknown. Therefore, the aim of this study was to better characterize the inflammatory process induced by cinnamaldehyde in the skin and to verify TRPA1's participation in this process.

## **Materials and methods**

### **Animals**

Experiments were performed on adult male Swiss mice (weight 25-35 g) bred in our animal house. The animals were kept in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) under a 12-h light-dark cycle. Food and water were freely available. The animals (4 to 6 per group) were acclimatized to the laboratory for at least 24 h before testing and



were used only once. All protocols are in accordance with the US guidelines for the care and use of laboratory animals (Zimmermann 1983) and all procedures were approved by our Institutional Ethics Committee (process numbers 67/2010). The number of animals used was the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the drug treatments.

### **Drugs and Reagents**

The following substances were used: allyl isothiocyanate, capsaicin, cinnamaldehyde, ammoniated ruthenium oxychloride (ruthenium red, RR), 4'-chloro-3-methoxycinnamanilide (SB366791), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA); 2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4 isopropylphenyl) acetamide (HC030031), formaldehyde, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), p-nitrofenil-2-acetamida- $\beta$ -D-glicopiranoside (NAG) and hexa decyltrimethylammonium bromide (HTAB). All substances were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Hematoxylin-eosin was purchased from MERCK (Whithouse Station, New Jersey, USA). Sodium acetate, acetone, acetic acid, ethanol, and camphor were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Halothane was purchased from Cristália (São Paulo, Brazil) and sodium citrate was purchased from Isofar (Rio de Janeiro, Brazil). Aprepitant was extracted from commercially available capsules (Emend<sup>®</sup>, Merck, USA), and its identity and purity were confirmed by nuclear resonance methods and were >98%.

### **Ear edema measurement**

Edema was expressed as an increase in ear thickness due to the chemical irritant challenge. Ear thickness was measured before and after induction of the

inflammatory response using a digital micrometer (Starret Series 734) in animals anesthetized with halothane. The micrometer was applied near the tip of the ear just distal to the cartilaginous ridges. The thickness was recorded in  $\mu\text{m}$ . To minimize variation, a single investigator performed the measurements throughout each experiment.

### **Irritant-induced skin inflammation**

Vehicle (acetone, 20  $\mu\text{l}/\text{ear}$ ) or cinnamaldehyde (8, 15, 32 and 45 nmol/ear corresponding to 1, 2, 4 and 6  $\mu\text{g}/\text{ear}$ , respectively) was applied to the right ear by topical administration according to the method described previously, with some modifications (Thorne et al. 1991; Gábor and Razga 1992). Another group of animals was given topical application of allyl isothiocyanate (10, 20, 40 and 60 nmol/ear corresponding to 1, 2, 4 and 6  $\mu\text{g}/\text{ear}$ , respectively) or capsaicin (328, 655 and 983 nmol/ear corresponding to 100, 200 and 300  $\mu\text{g}/\text{ear}$ , respectively) on their right ear (Gábor and Razga 1992; Inoue et al. 1997). The ear thickness was measured before and from 15 min to 8 h after topical application.

Separate groups of animals were topically pretreated with the non-selective TRP antagonist, RR (30-300 nmol/ear), the TRPA1 antagonists, camphor (30-1000 nmol/ear) or HC030031 (30-300 nmol/ear), the selective TRPV1 antagonist, SB366791 (10-100 nmol/ear) or the tachykinin receptor antagonist, aprepitant (30-300 nmol/ear). All compounds were diluted in acetone.

### **Effect of repeated topical application of capsaicin or cinnamaldehyde**

We investigated whether repeated ear exposure to cinnamaldehyde or capsaicin could induce the sensitization/desensitization process to its edematogenic effect.

Briefly, mouse ears were topically pretreated on days 1, 3 and 7 with acetone (20  $\mu$ l/ear), capsaicin (200  $\mu$ g/ear) or cinnamaldehyde (4  $\mu$ g/ear) in separate groups, as described previously (Inoue et al. 1997). After 8 days, the animals in each group were challenged with cinnamaldehyde (4  $\mu$ g/ear), capsaicin (200  $\mu$ g/ear) or acetone (P.A.). The development of edema was assessed, as described before, on days 1, 3, 7 and 8.

### **TRPA1 and TRPV1 expression**

The effect of the pretreatment with acetone, cinnamaldehyde or capsaicin on days 1, 3 and 7, on expression of the TRPA1 and TRPV1 receptors was assessed by western blot analysis. The assay was carried out as described previously (Ferreira et al. 2005) with minor modifications. The ear tissue was obtained on day 8 of the protocol and then homogenized in a lyses buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 10  $\mu$ g/mL aprotinin, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, 1 mM DTT and 2 mM of sodium orthovanadate. After centrifugation (11000 x g for 20 min at 4°C), the supernatant containing the membrane fraction was collected. The protein content was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard. Amounts of protein (80  $\mu$ g) were mixed in loading buffer (200 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 2.75 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.04% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Proteins were separated in 12% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gels (SDS–PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes according to the manufacturer's instructions (Perkin Elmer, USA). The membranes were incubated with Ponceau stain, which served as a loading control (Calvo et al. 2010). Afterwards, the membranes were dried, scanned and quantified

with Scion Image for Windows (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). Next, the membranes were washed, blocked with 1% Albumin from bovine serum (BSA) in TBS-T (0.05% Tween 20 in Tris-borate saline) and incubated for 10 min with diluted (1:150) primary antibodies against ANKTM1 anti-(TRPA1) or VR1 anti-(TRPV1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Membranes were processed using a SNAP i.d. system (Millipore, USA). Blots were washed three times with TBS-T followed by incubation with an alkaline phosphatase-coupled secondary antibody (1:3000) for 10 min. The protein bands were visualized with a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitro blue tetrazolium system (BCIP/NBT). Membranes were dried, scanned and quantified with Scion Image PC version of NIH image. The TRPA1 or TRPV1 western blot had a faint background that was corrected in image analysis.

### **Myeloperoxidase (MPO) assay**

Tissue MPO enzyme activity was assessed 6, 12 and 24 h after application of TRP agonists to the ear according to the technique described by Suzuki et al. (1983) with some modifications. Moreover, we analyzed the effect of pretreatment with the TRP antagonists camphor (300 nmol/ear), HC030031 (100 nmol/ear), ruthenium red (300 nmol/ear), SB366791 (100 nmol/ear) or the NK1 antagonist aprepitant (100 nmol/ear) in the cell infiltration induced by cinnamaldehyde (4 µg/ear). MPO enzyme activity in the tissue was assessed 12 h after these treatments. Tissue samples were homogenized with a motor-driven homogenizer in 300µl of acetate buffer (8 mM, pH 5.4) containing 0.5% HTAB (45 s at 0°C). The homogenate was centrifuged at 11000 x g at 4°C for 20 min, and the supernatants were stored at -4°C.

For evaluation of MPO activity, 10  $\mu$ L of supernatant was incubated with 200  $\mu$ l of acetate buffer (8 mM, pH 5.4) and 40  $\mu$ l of TMB (18.4 mM) at 37 °C for 3 min. The reaction was stopped with 30  $\mu$ L of acetic acid in a cold bath, and the enzyme activity value was assessed colorimetrically at 630 nm using a microplate reader. The results were expressed as optical density (OD)/g of tissue.

### **Histology**

To verify histological changes in the mouse ear after capsaicin, allyl isothiocyanate or cinnamaldehyde application, samples were collected 0.5, 6, 12 and 24 h after the induction of inflammation. Mice were euthanized and ear tissue was removed and fixed in alfac solution (a 16:2:1 mixture of ethanol 80%, formaldehyde 40% and acetic acid). Each sample was embedded in paraffin wax, sectioned at 5  $\mu$ m and stained with hematoxylin-eosin. A representative area was selected for qualitative light microscopic analysis of the inflammatory cellular response with a 40x objective lens (Recio et al. 2000). To minimize a source of bias, the investigator analyzed the specimens blindly.

### **Immunohistochemistry**

To confirm the migration of neutrophils 24 h after the application of cinnamaldehyde, immunohistochemistry was performed as previously described (Pomonis et al. 2001; Chichorro et al. 2009) with minor modifications. Mice were sacrificed and ear tissue was removed, placed in Tissue-Tek<sup>®</sup> embedding medium and rapidly frozen in liquid nitrogen. Frozen 10  $\mu$ m sections were cut on a cryostat and thaw-mounted onto gelatin-coated slides. These slides were rinsed for 10 min in PBS (pH 7.4, 25°C), fixed in acetone at 4°C for 20 min, rinsed again in PBS for another 10 min and then

incubated for 30 min in blocking solution (1% BSA and 0.3% Triton X-100 in PBS). The blocking solution was then removed and the sections were incubated overnight at 4°C with the stains for neutrophil identification biotin rat anti-mouse Ly-6G (each at 1:100, BD Biosciences, California, USA). After this incubation, the slides were rinsed once more in PBS and incubated at room temperature for 2 h with Streptavidin – Phycoerythrin (PE) conjugate (BD Biosciences, California, USA), each at 1:200. After this incubation, the slides were again washed with PBS and incubated at room temperature for 15 min with 0.5 nM DAPI (Sigma, St. Louis, USA). After washing, all slides were mounted with Fluoromount-G and photographed with a Zeiss Axiophot photomicroscope (Carl Zeiss, Inc., 7082 Oberkochen, Germany) equipped with Zeiss IV FL vertical illumination for epifluorescence and a fluorescein filter system (Blue 450-490 SB). They were then analyzed with specific software Laser Sharp 2000 (Bio Rad Hercules, CA, USA), and the cell count was performed using ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, USA).

### **Statistical analysis**

The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M., except for the ED<sub>50</sub> values (i.e., the dose of allyl isothiocyanate, cinnamaldehyde or capsaicin producing edema at 50% of their maximal response), which were expressed as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. ED<sub>50</sub> values were determined using non-linear regression and GraphPad Prism 5. The maximal effect (E<sub>max</sub>) was calculated as the increase in the difference in ear thickness produced by allyl isothiocyanate, cinnamaldehyde or capsaicin and subtracted from the vehicle group. Data were subjected to the student's t-test or to one- or two-way ANOVAs followed by Student-

Newman-Keuls' or Bonferroni's post hoc tests, when appropriate.  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### Characterization of edema induced by cinnamaldehyde and other TRP receptor agonists

The cinnamaldehyde-induced edema (4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) became detectable 15 min after application and reached its maximal effect at 30 min and lasted for 1 h (Figure 1A). The edematogenic effects induced by allyl isothiocyanate (4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) or capsaicin (200  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) also peaked 30 min after application. However, the effects were longer than for cinnamaldehyde, lasting up to 6 and 2 h after their applications, respectively (Figure 1C and E). Based on these results, dose-response edema curves were made 30 min after the application of cinnamaldehyde (1-6  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ), allyl isothiocyanate (1-6  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) or capsaicin (100-300  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ).

The edematogenic effect produced by cinnamaldehyde presented an  $E_{\text{max}}$  of  $0.18 \pm 0.02$  mm and an  $ED_{50}$  value of 2.0 (1.1- 3.4)  $\mu\text{g}/\text{ear}$  that is equivalent to (15 (8-26) nmoles/ear) (Figure 1B). Allyl isothiocyanate was as potent as cinnamaldehyde ( $ED_{50} = 1.3$  (0.9-1.7)  $\mu\text{g}/\text{ear}$  or 13 (9-17) nmoles/ear), but it was more efficacious ( $E_{\text{max}} = 0.36 \pm 0.02$  mm) in inducing ear edema (Figure 1D). Capsaicin was less potent than the TRPA1 agonists ( $ED_{50} = 114.4$  (62.1 – 210.9)  $\mu\text{g}/\text{ear}$  or 373 (203-690) nmoles/ear), but it was as efficacious as cinnamaldehyde ( $E_{\text{max}} = 0.25 \pm 0.04$  mm) in producing edema (Figure 1F). In subsequent experiments, the inflammatory response was usually induced by the application of cinnamaldehyde (4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ), allyl

isothiocyanate (4 µg/ear) and capsaicin (200 µg/ear), and edema was assessed 30 min after each application.

### **Effect of TRP receptor antagonists on the edematogenic responses produced by cinnamaldehyde, allyl isothiocyanate or capsaicin**

Animals were pretreated topically with different TRP antagonists 15 min prior to application of the agonist. Dose-response curves were obtained for the non-selective TRP antagonist, RR (30-300 nmol/ear), the TRPA1 antagonists, camphor (30-1000 nmol/ear) and HC030031 (30-300 nmol/ear), the TRPV1 antagonist, SB366791 (10-100 nmol/ear) and the tachykinin NK1 antagonist, aprepitant (30-300 nmol/ear). As expected, RR inhibited edema formation in mouse ears treated with cinnamaldehyde, allyl isothiocyanate or capsaicin by  $55 \pm 7\%$ ,  $38 \pm 2\%$  and  $52 \pm 5\%$ , respectively (Figures 2A, 3A and D). Camphor was able to inhibit cinnamaldehyde- and allyl isothiocyanate-induced edema by  $68 \pm 6\%$  and  $24 \pm 5\%$ , respectively, but it did not inhibit the capsaicin-induced edema (Figures 2C, 3B and F). HC030031 and aprepitant also prevented the edema formation in mouse ears treated with cinnamaldehyde by  $64 \pm 5\%$  and  $44 \pm 7\%$ , respectively (Figures 2D and E). Furthermore, SB366791 was capable of reducing the capsaicin-induced edema by  $48 \pm 6\%$  (Figure 3E) but not the cinnamaldehyde- or allyl isothiocyanate-induced edematogenic responses (Figures 2B and 3C).

### **Effect of repeated topical application of cinnamaldehyde or capsaicin**

An initial topical application of cinnamaldehyde (4 µg/ear) or capsaicin (200 µg/ear) produced a marked edematogenic response when compared to vehicle (Figure 4A, day 1), similar to the effect described above. A reduction in edema was observed



after the second and third challenges with capsaicin by  $27 \pm 7\%$  and  $54 \pm 6\%$ , respectively, indicating a desensitization process (Figure 4A). On the other hand, repeated challenges with cinnamaldehyde did not alter the edematogenic response, demonstrating that neither sensitization nor desensitization processes occur in cinnamaldehyde-induced ear edema (Figure 4A).

To verify a possible cross-desensitization between capsaicin and cinnamaldehyde, we pretreated animals topically with capsaicin, cinnamaldehyde or acetone in separate groups (pretreatment on days 1, 3 and 7) and treated the three groups with the same substances on day 8. In ears pre-treated with cinnamaldehyde, no alteration in the edematogenic response of cinnamaldehyde on day 8 was detected, but a partial reduction in the capsaicin-response was observed ( $40 \pm 5\%$ ) (Figure 4B). However, pretreatment with capsaicin not only abrogated the edema evoked by capsaicin treatment ( $88 \pm 3\%$  of reduction), but it also significantly decreased the cinnamaldehyde-induced edema ( $62 \pm 14\%$  of reduction) (Figure 4B). There were no differences between the edema response to capsaicin, cinnamaldehyde or control after acetone pretreatment (Figure 4B).

To test a possible alteration in the protein expression of TRPA1 or TRPV1 on day 8 after pretreating the ears on days 1, 3 and 7 with cinnamaldehyde, capsaicin or vehicle, we carried out western blot analysis. This analysis showed that the expression levels of these receptors did not change in the different groups (Figure 5), suggesting that the desensitization process induced by topical application of capsaicin and cinnamaldehyde was independent of alterations in protein expression.

### **Cinnamaldehyde-induced leukocyte infiltration in mouse ear skin**

Since TRPA1 or TRPV1 activators can induce edema, we also investigated whether they could cause leukocyte infiltration into the affected tissue. We measured MPO activity, which is an enzyme used as a neutrophil infiltration marker. Following topical application of the irritants, MPO activity was maximal at 24 h for cinnamaldehyde, 12h for capsaicin and 6 and 12 h for allyl isothiocyanate (Figure 6A, C and D). The MPO activity was measured 30 min after cinnamaldehyde application, but no significant increase in the enzyme activity were observed ( $13 \pm 1\%$  of increase).

To verify the participation of the TRP receptor in the cell infiltration induced by cinnamaldehyde (4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ), we analyzed the effect of pretreatment with camphor (300 nmol/ear), HC030031 (100 nmol/ear), RR (300 nmol/ear), SB366791 (100 nmol/ear) or aprepitant (100 nmol/ear) on MPO activity. Similar to the edema formation, HC030031, camphor and RR were able to prevent the increase in MPO activity caused by cinnamaldehyde in the mouse ear by  $63 \pm 9\%$ ,  $67 \pm 6\%$ , and  $52 \pm 9\%$ , respectively (Figure 6B). Pretreating animals with aprepitant caused an inhibition of the leukocyte infiltration induced by cinnamaldehyde treatment by  $25 \pm 10\%$ , but this inhibition was not significant.

### **Histological profile of cinnamaldehyde-, allyl isothiocyanate- and capsaicin-induced ear inflammation**

Once we observed the development of an inflammatory process after cinnamaldehyde application, we investigated histological changes in the ear tissue after the application of irritants. Histological examination clearly revealed the edematogenic response in the tissue 30 min after a single topical application of 20% cinnamaldehyde (Figure 7 B). Additionally, leukocyte infiltration was evaluated 6, 12 and 24 h post-challenge. As observed with the MPO assay, the infiltration was more

intense 24 h after the administration of cinnamaldehyde (Figure 7 H). These data differ from allyl isothiocyanate and capsaicin treatment, which showed an increase in the amount of infiltrating leukocytes at 12 h (data not shown).

### **Quantification of neutrophils by immunohistochemistry**

The MPO assay showed that leukocyte infiltration at 24 h was significant. Thus, we verified that this migration is in fact neutrophilic using immunohistochemistry of ear tissue after the application of the irritants. Immunohistochemical examination showed the migration of neutrophils after a 24 h single application of 20% cinnamaldehyde (Figure 8).

### **Discussion**

The present study shows that the topical application of cinnamaldehyde on mouse ears causes acute inflammatory responses with edema formation and leukocyte infiltration, which are dependent on TRPA1 activation in sensory neurons and other cellular types.

Irritant contact dermatitis is one of the most common skin diseases with a lifetime prevalence of over 30% (Kadyk et al. 2003; Slodownik et al. 2008). At concentrations between 3% and 8%, cinnamaldehyde produces local harm and severe irritations (for review see: Bickers et al. 2005). Topical cinnamaldehyde also induces erythema and edema in guinea pigs, rabbits and mice (Lathi et al. 1984, 1986; for review see: Bickers et al. 2005). We confirmed these data showing that topical cinnamaldehyde application above 5% (2 µg/ear) induced rapid edema formation in the mouse ear when assessed by ear thickness measurements and histological analyses. Our

results are in accordance with Thorne et al. (1991) who demonstrated that 5 to 20% (corresponding to 1 and 4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) cinnamaldehyde produced an edematogenic response in the mouse ear 1 h post-challenge. It is important to mention that the concentration of topically-applied cinnamaldehyde may increase with the time since the vehicle used to dissolve it (acetone) vaporizes. Moreover, we observed that acetone application alone did not induce edema when compared with the contralateral ear. Accordingly, it has been demonstrated that acetone induces edema in sensitized, but not in non-sensitized skin (Pozsgai et al. 2007). Curiously, some in vitro studies indicated that cinnamaldehyde may promote anti-inflammatory-like actions in cultivated or isolated cells (such as, the reduction in the expression in pro-inflammatory genes) (Guo et al. 2006; Kim et al. 2007). Together, these findings indicate that the pro-inflammatory action of cinnamaldehyde depends on tissue integrity and the mouse ear edema is a good model to predict and study irritant contact dermatitis produced by cinnamaldehyde.

We also compared the ear edema caused by cinnamaldehyde with other natural irritant compounds that activate TRP channels, namely allyl isothiocyanate and capsaicin. On the other hand, cinnamaldehyde was as potent as allyl isothiocyanate and more potent than capsaicin at inducing edema. Studies applying TRP agonists in vitro or through subcutaneous injection have shown that capsaicin is more potent than cinnamaldehyde and allyl isothiocyanate at producing nociceptive responses (Andrade et al. 2006). Since our experiments applied the TRP agonists topically, the differences in skin penetration among these compounds could explain this discrepancy. Molecular size, ionization state and fat solubility determine skin penetration, and these factors could differentially contribute to irritancy (for review see: Bickers et al. 2005). Accordingly, the skin penetration after topical application of

cinnamaldehyde is about 55%, while it is roughly 5% for capsaicin (for review see: Bickers et al. 2005; Kasting et al. 1997). Furthermore, topical allyl isothiocyanate was more effective than cinnamaldehyde or capsaicin at producing ear edema. Besides skin penetration, this finding may be also explained by the fact that cinnamaldehyde has been considered to be more selective than allyl isothiocyanate in activate TRPA1 (Bandell et al. 2004).

Besides edema, leukocyte infiltration is another characteristic of irritant contact dermatitis. We have shown that cinnamaldehyde and capsaicin not only produced ear edema, but also induced leukocyte infiltration after topical application on skin. Our results are in accordance with previous studies where topical allyl isothiocyanate increased MPO activity in treated mouse ears (Bánvolgyi et al. 2004). After 6, 12 and 24 h of cinnamaldehyde application, MPO activity was significantly enhanced; however, allyl isothiocyanate and capsaicin applications increased MPO activity after 6 and 12 h and 6 h, respectively. In accordance with our MPO activity findings, neutrophil infiltration was also confirmed by histological and immunohistochemical analysis, demonstrating leukocyte infiltration at least up to 24 h after cinnamaldehyde topical application. In the time of the edema peak (30 min after application), cinnamaldehyde did not alter neither MPO activity in ear samples nor leukocyte detection in histology demonstrating that the early phase of the TRPA1 agonist-induced edema is unrelated with neutrophil infiltration.

The cinnamaldehyde inflammatory response, similar to that of allyl isothiocyanate and capsaicin, could be dependent on TRP receptor activation. This fact was confirmed by the ability of RR, a non-selective TRP receptor antagonist, to prevent the edematogenic effect of all three substances. More selectively, the TRPA1 receptor antagonists HC030031 and camphor, were effective at inhibiting

cinnamaldehyde- and allyl isothiocyanate-induced mouse ear edema, whereas the selective TRPV1 receptor antagonist SB366791 prevented only the capsaicin-induced response. Furthermore, ruthenium red, HC030031 and camphor, but not SB366791, reduced the increase in MPO activity induced by cinnamaldehyde. These results indicate that activation of the TRP receptor, more specifically TRPA1 stimulation, is essential for the inflammatory effects triggered by the topical application of cinnamaldehyde. Recent studies showed that camphor activates and desensitizes TRPV1 (Macpherson et al. 2006; Xu et al. 2005). We believe that this activation could interfere with TRPV1's anti-edematogenic effect. However, topical applications of 30, 300 and 1000 nmol/ear of camphor did not evoke ear edema (data not shown), suggesting that it does not act through the TRPV1 receptor in experimental conditions tested here.

TRPA1 receptor activation by allyl isothiocyanate can lead to neurogenic inflammation characterized by the release of neuropeptides from afferent sensory neurons and subsequent vascular responses. These neuropeptides include substance P (SP) and act preferentially via the tachykinin NK1 receptor, which is localized in cutaneous sensory nerve endings and mouse skin cells, such as keratinocytes (Inoue et al. 1997; Scholzen et al. 1998; Peters et al. 2006). Cutaneous innervations appear to be changed in a number of inflammatory skin diseases, including dermatitis, where there is an increase in the SP density (for review see: Peter et al. 2006). We prevented the cinnamaldehyde induced-edema and leukocyte influx by pretreatment with the selective NK1 receptor antagonist, aprepitant, suggesting that the release of SP is an important mechanism in the cinnamaldehyde-evoked inflammatory response.

A single administration of cinnamaldehyde was evaluated for its sensitization/desensitization capacity by treating animals on days 1, 3 and 7. No alterations were observed in cinnamaldehyde-induced edema on days 1, 3 or 7. The lack of alteration in the cinnamaldehyde response is in accordance with previous human studies that show very low skin sensitization potential in volunteers after topical cinnamaldehyde administration (for review see: Bickers et al. 2005). Similar to the cinnamaldehyde effect, Inoue and coworkers (1997) reported that the plasma extravasation evoked after reapplication of the TRPA1 receptor agonist, allyl isothiocyanate, on days 1, 3 and 7 was not different from that induced after its initial application. Moreover, Dunham et al. (2008) also failed to detect sensitization or desensitization to cinnamaldehyde-induced activation of primary afferent fibers in rats when the stimulus was injected each five minutes. On the other hand, other studies were capable of detecting desensitization to allyl isothiocyanate-induced currents in sensory neurons, neuropeptide release in skin or nociception in rats when the interstimuli interval was from 3 to 20 min (Akopian et al., 2007; Ruparel et al., 2008). Thus, the ability of TRPA1 agonists to induce desensitization seems to be dependent of the experimental model used and the interval between the stimuli.

Previous studies have demonstrated that repeated topical applications of capsaicin lead to a functional desensitization of a subset of small diameter primary afferent fibers, which were named capsaicin-sensitive fibers (Janicsó et al. 1967; Inoue et al. 1995). As TRPA1 is expressed in capsaicin-sensitive fibers, we induced desensitization of capsaicin-sensitive fibers and examined the cinnamaldehyde response. As expected, capsaicin-repeated treatment abrogated its edematogenic response, confirming the desensitization process. Moreover, the pretreatment with capsaicin decreased, but did not abolish, the cinnamaldehyde-induced edema.

These results suggest the relevant but not essential role of capsaicin-sensitive fibers in cinnamaldehyde-induced inflammation. Furthermore, the reduction in capsaicin-induced edema by cinnamaldehyde pretreatment is in accordance with the idea of a complex interaction between TRPA1 and TRPV1 as demonstrated in sensory neurons. In fact, there is heterologous desensitization of capsaicin and allyl isothiocyanate in several responses, such as currents in sensory neurons, neuropeptide release in skin or nociception in rats (Akopian et al., 2007; Ruparel et al., 2008). This desensitization uses different cellular pathways, is agonist dependent and regulated by internalization.

Desensitization of TRP channels can be mediated by several cellular pathways after repeated activation, such as changes in protein expression (Akopian et al. 2007). We observed that the TRPA1 and TRPV1 receptors' protein expression did not change after cinnamaldehyde or capsaicin treatment in comparison to ears treated with acetone. This finding suggests the involvement of other cellular pathways, such as phosphorylation, internalization or calcium-dependence, in the desensitization process induced by cinnamaldehyde. Since the heterologous desensitization to TRPA1 and TRPV1 agonists was not complete, factors others than intracellular pathways, such as the particular expression of these receptors in different cells, may be involved. In fact, it has been recently demonstrated that TRPA1 is expressed in sensory neurons that do not express TRPV1 and in skin cells other than neurons, such as keratinocytes (Atoyan et al. 2009; Birö and Kovács 2009). Thus, more studies must to be carried out to investigate the mechanisms related to desensitization between TRPA1 agonists in ear edema.

## Conclusions



In conclusion, we demonstrated that the topical application of cinnamaldehyde to the mouse ear produces an acute skin inflammatory response dependent on TRPA1 receptor stimulation. Our findings suggest a possible role for TRPA1 in inflammatory skin reactions.

### **Acknowledgments**

This study was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil. The fellowships from CNPq and CAPES are also acknowledged.

## References

- Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol* 2007; 583: 175-93.
- Andrade EL, Ferreira J, André E, Calixto JB. Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. *Biochem Pharmacol* 2006; 28: 104-14.
- Atoyan R, Shander D, Botchkareva NV. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Investig Dermatol* 2009; 129: 2312-15.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004; 41: 849-57.
- Bánvolgyi A, Pozsgai G, Brain S, Helyes Z, Szolcsa J, Ghosh M, Meleghe B, Pintéra E. Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice. *Neuroscience* 2004; 125: 449–59.
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 12248-52.
- Bickers D, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, Sipes IG, Smith RL, Tagami H. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 799-836.

- Birô T, Kovács L. An “Ice-Cold” TR(i)P to Skin Biology: The Role of TRPA1 in Human Epidermal Keratinocytes. *J Investig Dermatol* 2009; 129: 2096–99.
- Calixto JB, Kassuya CA, André E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Therap* 2005; 106: 179-208.
- Calvo IR, Ocón B, Moya PM, Suárez MD, Zarzuelo A, Augustin OM. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to action in Western blots. *Anal Biochem* 2010; 401: 318-20.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816-24.
- Caspani O, Heppenstall PA. TRPA1 and Cold Transduction: An Unresolved Issue? *J Gen Physiol* 2008; 133: 245-49.
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 2004; 432: 723–30.
- Chichorro JG, Zampronio AR, Cabrini DA, Franco CR, Rae GA. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides* 2009; 43: 133-42.
- Cocchiara J, Letizia CS, Lalko J, Lapczynski A, Api AM. Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 867–923.

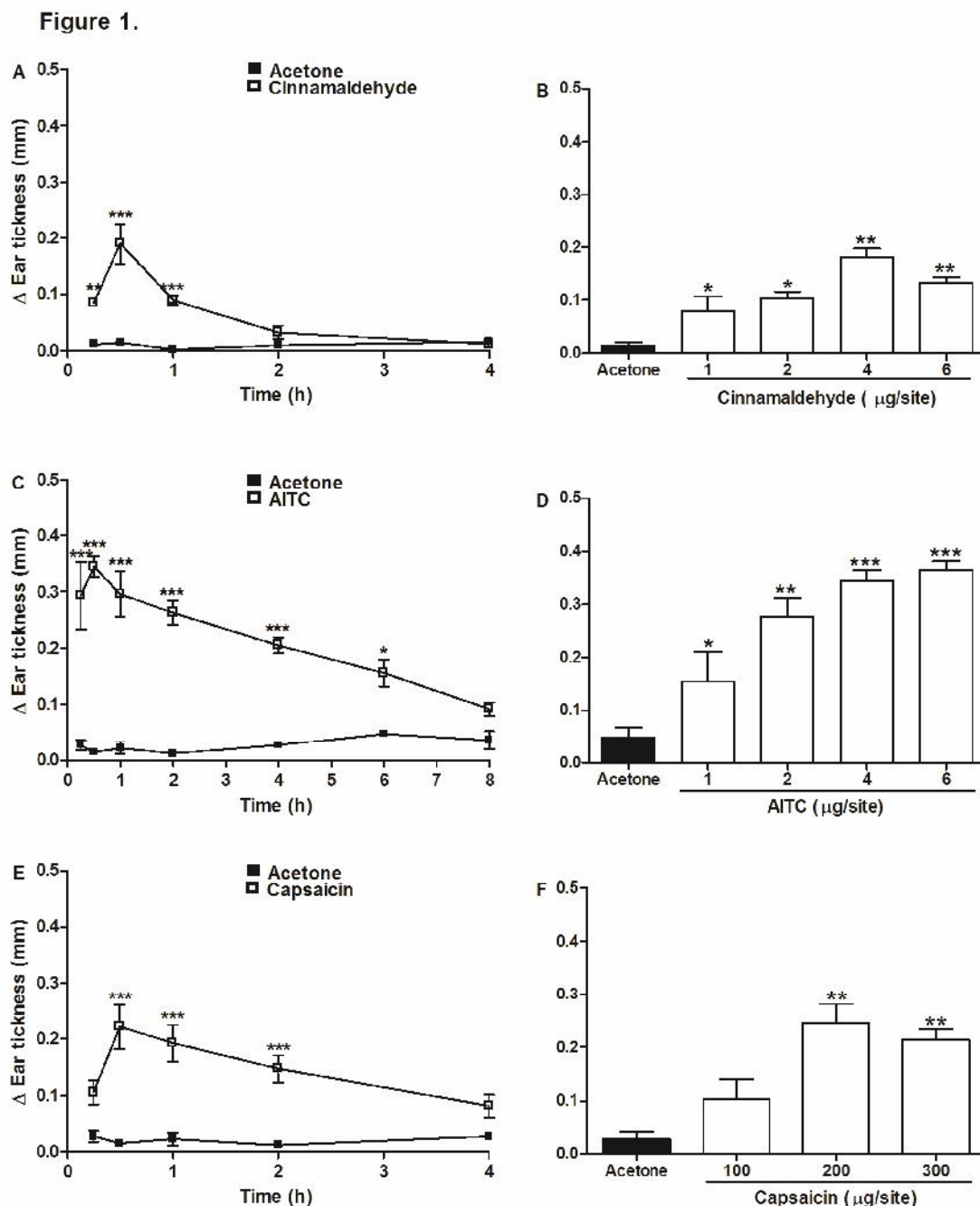
- Dunham JP, Kelly S, Donaldson LF. Inflammation reduces mechanical thresholds in a population of transient receptor potential channel A1-expressing nociceptors in the rat. *Eur J Neurosci.* 2008; 27: 3151-60.
- Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, Calixto JB. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 2005; 117: 171-81.
- Gábor M, Ra'zga Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. *Agents Actions* 1992; 36: 83–6.
- Gamse R, Holzer P, Lembeck F. Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Br J Pharmacol* 1980; 68: 207-13.
- Guo JY, Huo HR, Zhao BS, Liu HB, Li LF, Ma YY, Guo SY, Jiang TL. Cinnamaldehyde reduces IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 activity in rat cerebral microvascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2006; 537: 174-80.
- Huang CH, Kuo IC, Xu H, Lee YS, Chua KY. Mite allergen induces allergic dermatitis with concomitant neurogenic inflammation in mouse. *J Investig Dermatol* 2003; 121: 289–93.
- Inoue H, Nagata N, Koshihara Y. Involvement of substance P as a mediator in capsaicin-induced mouse ear oedema. *Inflamm Res* 1995; 44: 470-4.
- Inoue H, Asaka T, Nagata N, Koshihara, Y. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 1997; 333: 231- 40.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol* 1967; 31: 138-51.

- Jancsó N, Kiraly E, Jancsó-Gábor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 1977; 270: 741-3.
- Johansen JD, Andersen KE, Rastogi SC. Threshold responses in cinnamic-aldehyde-sensitive subjects: Results and methodological aspects. *Contact Derm* 1996; 34: 165-71.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; 427:260-5.
- Kadyk DL, McCarter K, Achen F, Belsito DV. Quality of life in patients with allergic contact dermatitis. *Am Acad Dermatol* 2003; 49: 1037–48.
- Kasting GB, Francis WR, Bowman, LA, Kinnett GO. Percutaneous absorption of vanilloids: in vivo and in vitro studies. *J Pharm Sci* 1997; 86: 142-6.
- Kim DK, Lillehoj HS, Lee SH, Jang SI, Bravo D. High-throughput gene expression analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral feeding of carvacrol, cinnamaldehyde, or Capsicum oleoresin. *Poult Sci* 2010; 89: 68-81.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey, DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 2006; 50: 277–89.
- Lahti A, McDonald DM, Tammi R, Maibach HI. Pharmacological studies on nonimmunologic contact urticaria in guinea pigs. *Arch Dermatol Res* 1986; 279: 44-9.
- Lahti A, Maibach HI. An animal model for nonimmunologic contact urticaria. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 76: 219-24.

- Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosc* 2006; 32: 335-43.
- Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105 (25): 8784-9.
- Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, Paus R, Scholzen TE. Neuropeptide Control Mechanisms in Cutaneous Biology: Physiological and Clinical Significance. *J Investig Dermatol* 2006; 126: 1937- 47.
- Pomonis JD, Rogers SD, Peters CM, Ghilardi JR, Mantyh PW. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. *J Neurosci* 2001; 21: 1999-2006.
- Pozsgai G, Sándor K, Perkecz A, Szolcsányi J, Helyes Z, Brain SD, Pintér E. Topical acetone treatment induces neurogenic oedema on the sensitized mouse ear: an in vivo study using transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor knockout mice. *Inflamm Res.* 2007; 56: 459-67.
- Recio MC, Giner RM, Uriburu L, Mánêz S, Cerda´ M, De la Fuente JR, Ríos JL. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci* 2000; 66: 2509– 18.
- Ruparel NB, Patwardhan AM, Akopian AN, Hargreaves KM. Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. *Pain* 2008; 135: 271–9.
- Slodownik D, Lee A, Nixon R. Irritant contact dermatitis: A review. *Australas J Dermatol.* 2008; 49: 1–11.

- Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 1998; 7: 81–96.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan, S., Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003; 112: 819-29.
- Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983; 132: 345–52.
- Thorne PS, Hawk C, Kaliszewski SD, Guiney PD. The noninvasive mouse ear swelling assay. II. Testing the contact sensitizing potency of fragrances. *Fundam Appl Toxicol* 1991, 17: 807- 20.
- Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, André E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *PNAS* 2007; 104: 13519-24.
- Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci* 2005; 25: 8924–37.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109-10.
- Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>. *Nat Neurosci*. 2007; 10: 277-9.

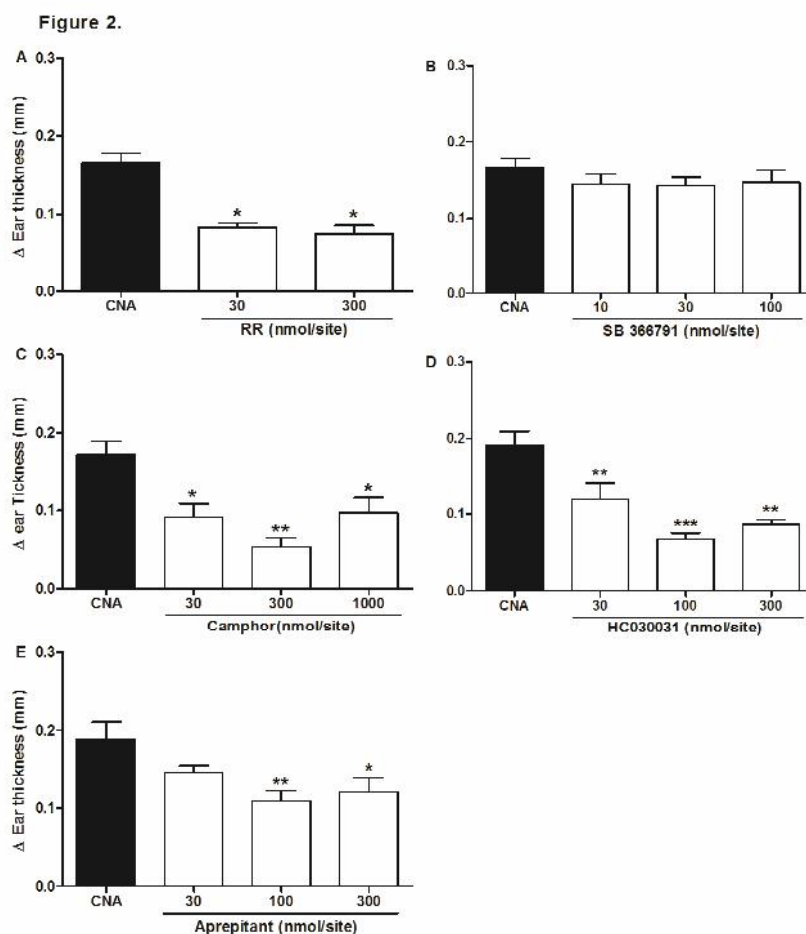
## 6. FIGURE AND LEGENDS



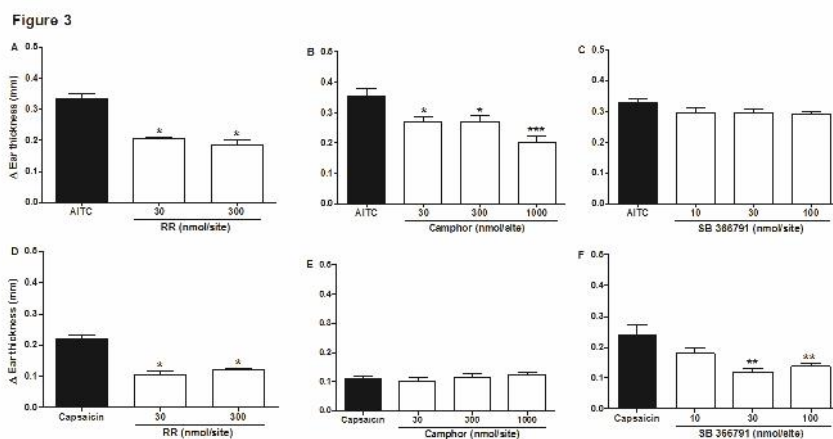
**Figure 1. Ear edema induced by cinnamaldehyde and other TRP receptor agonists.** Time-course and dose-response curves of mouse ear edema induced by topical application of cinnamaldehyde (A, B), allyl isothiocyanate (AITC) (C, D) and capsaicin (E, F). The effects of these compounds are expressed as a change in ear thickness. Each column or point, denoted as ( $\square$ ) for irritant substances or ( $\blacksquare$ ) for



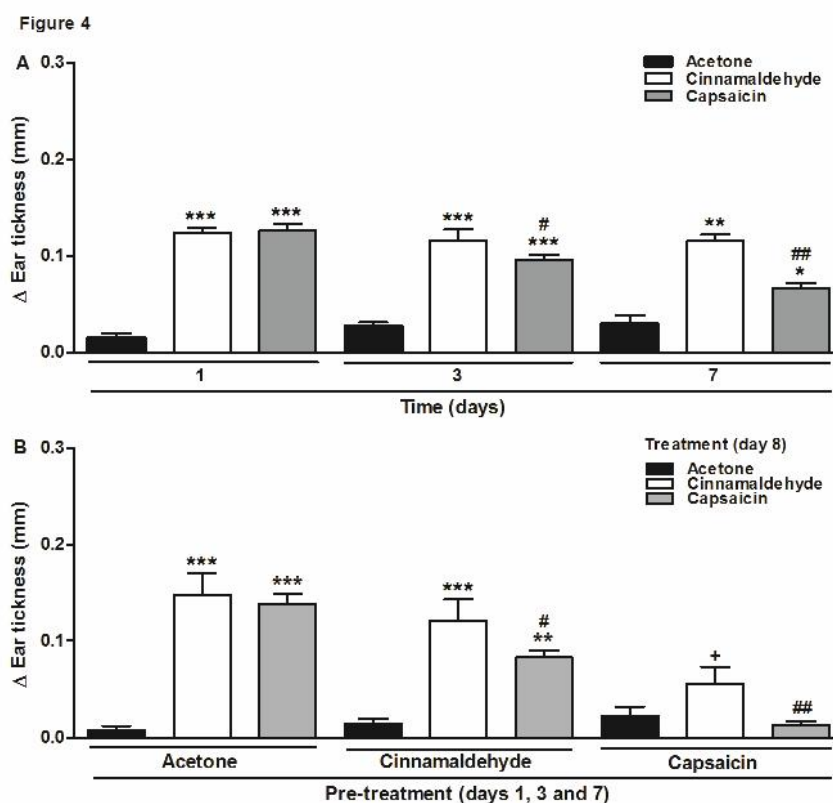
acetone control, represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 animals. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001 vs. acetone control.



**Figure 2. Effect of TRP receptor antagonists on the edematogenic responses produced by cinnamaldehyde.** Effect of TRP antagonists, ruthenium red (RR), SB366791, camphor, and HC030031, and the tachykinin NK1 antagonist, aprepitant, on mouse ear thickness applied 15 min before the topical administration of 4  $\mu$ g of cinnamaldehyde (CNA). Edema was measured 30 min after the administration of each compound and is expressed as the change in ear thickness. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 animals. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001 vs. CNA



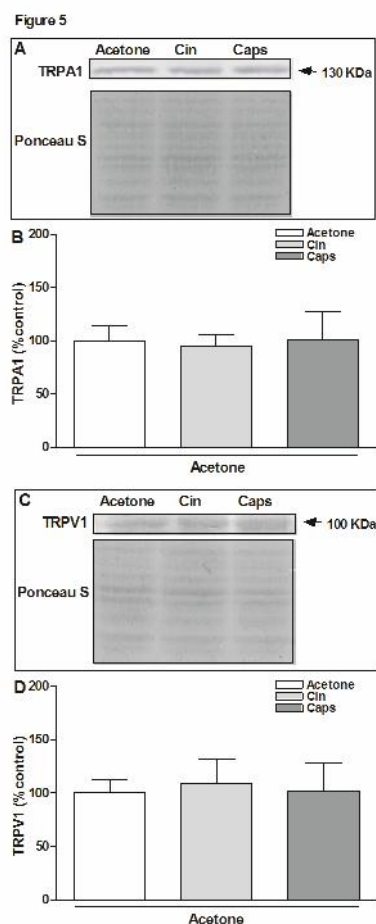
**Figure 3. Effect of TRP receptor antagonists on the edematogenic responses produced by allyl isothiocyanate or capsaicin.** Effect of the TRP antagonists, ruthenium red (RR), camphor and SB366791, on mouse ear thickness applied 15 min before the topical administration of 4  $\mu$ g of allyl isothiocyanate (AITC) (A,B,C) or 200  $\mu$ g of capsaicin (D,E,F). The edema was measured 30 min after the administration of each compound and is expressed as a change in ear thickness. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 5 animals. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. AITC or capsaicin.



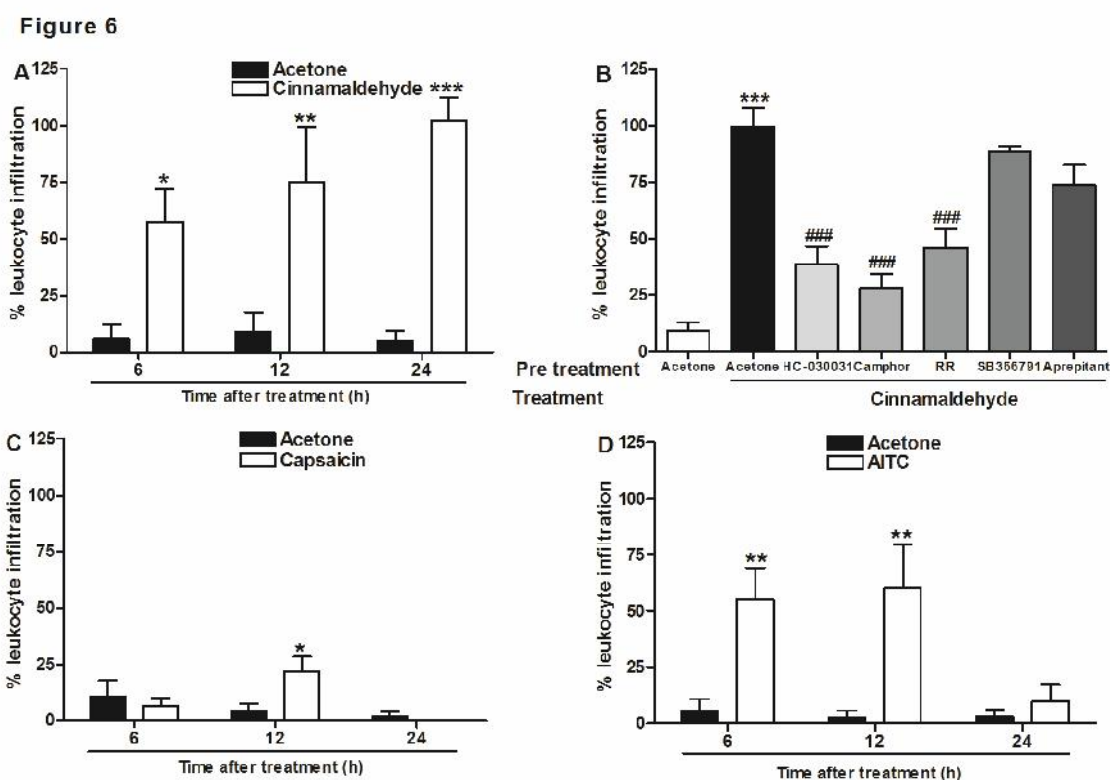
**Figure 4. Effect of repeated topical application of cinnamaldehyde or capsaicin.**

(A) Effect of pretreatment with cinnamaldehyde (4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) or capsaicin (200  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) on days 1, 3 and 7 on ear edema. The edema was measured 30 min after the administration of each compound and is expressed as a change in ear thickness. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 animals. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. acetone control. # $P < 0.05$  and ## $P < 0.01$  for capsaicin response at days 3 and 7 vs. day 1. (B) Effect of treatment with cinnamaldehyde (4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) or capsaicin (200  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) on ear edema after pretreatment with control (acetone 20  $\mu\text{l}/\text{ear}$ ), capsaicin (200  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) or cinnamaldehyde (4  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) on days 1, 3 and 7. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 animals. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. acetone control. # $P < 0.05$  and ## $P < 0.01$  for capsaicin response after pretreatment with cinnamaldehyde or capsaicin vs. acetone pretreatment. + for

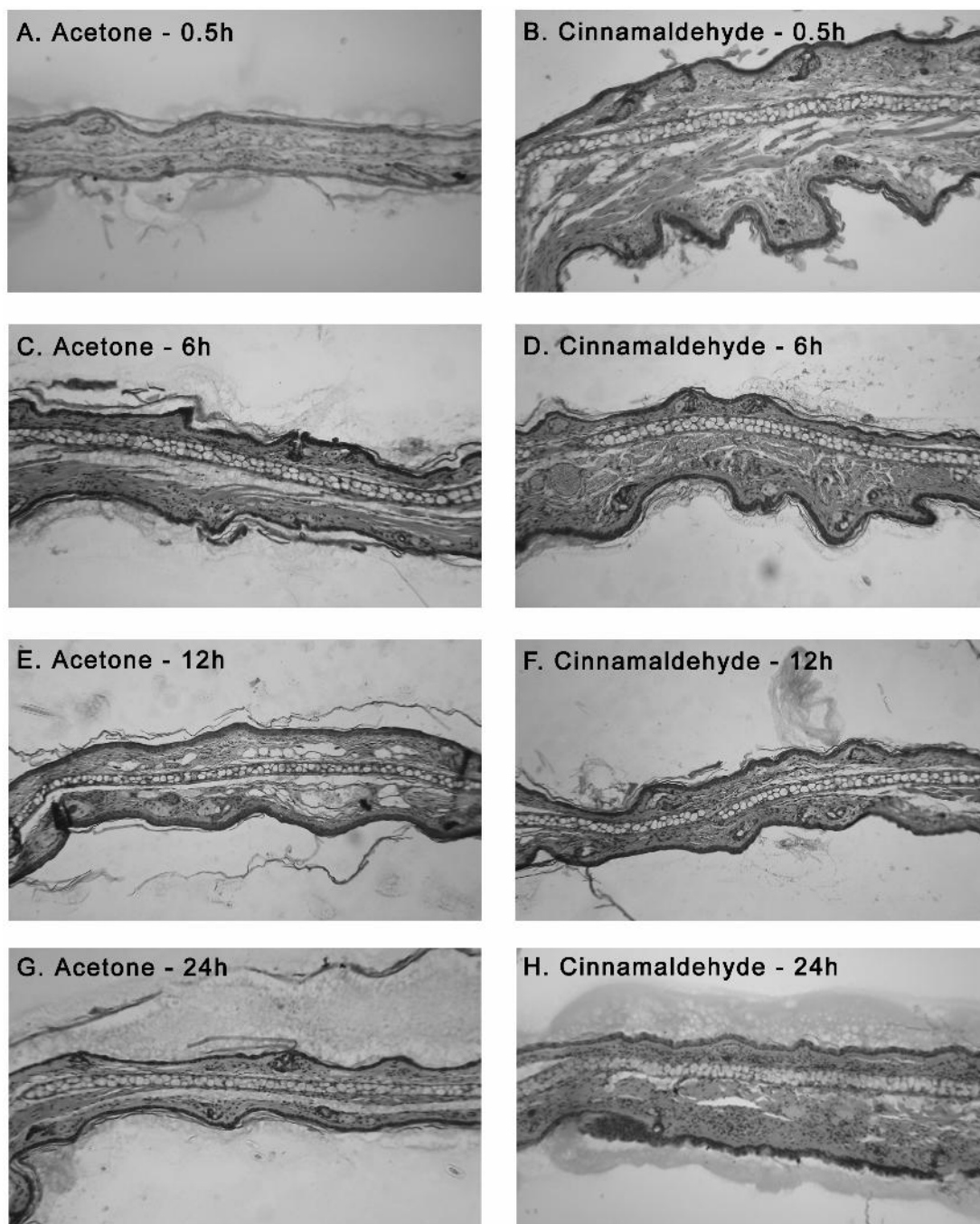
cinnamaldehyde effect in the group pretreated with capsaicin vs. pretreatment with acetone.



**Figure 5. TRPA1 and TRPV1 expression.** Western blot analysis showing TRPA1 (A and B) and TRPV1 (C and D) protein expression in mouse ears 8 days after topical application of 20  $\mu$ l of acetone, 4  $\mu$ g/ear of cinnamaldehyde or 200  $\mu$ g/ear of capsaicin on days 1, 3 and 7. In A and C are demonstrated representative TRPA1 and TRPV1 immunoreactivity, and in B and D are indicated the densitometry analysis. To demonstrate equal loading, a representative Ponceau stained protein band is also shown (A, C). The results were expressed as % of the control (acetone). The results in B and D were represented as arbitrary density unit. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 3 mice. No significant differences between groups were found.

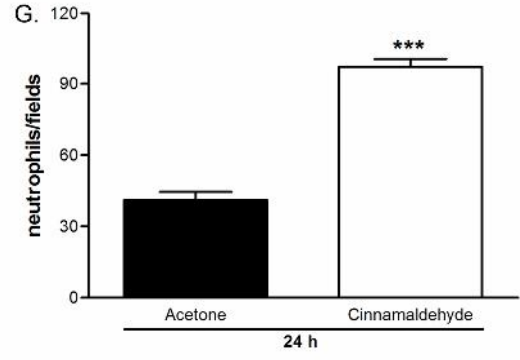
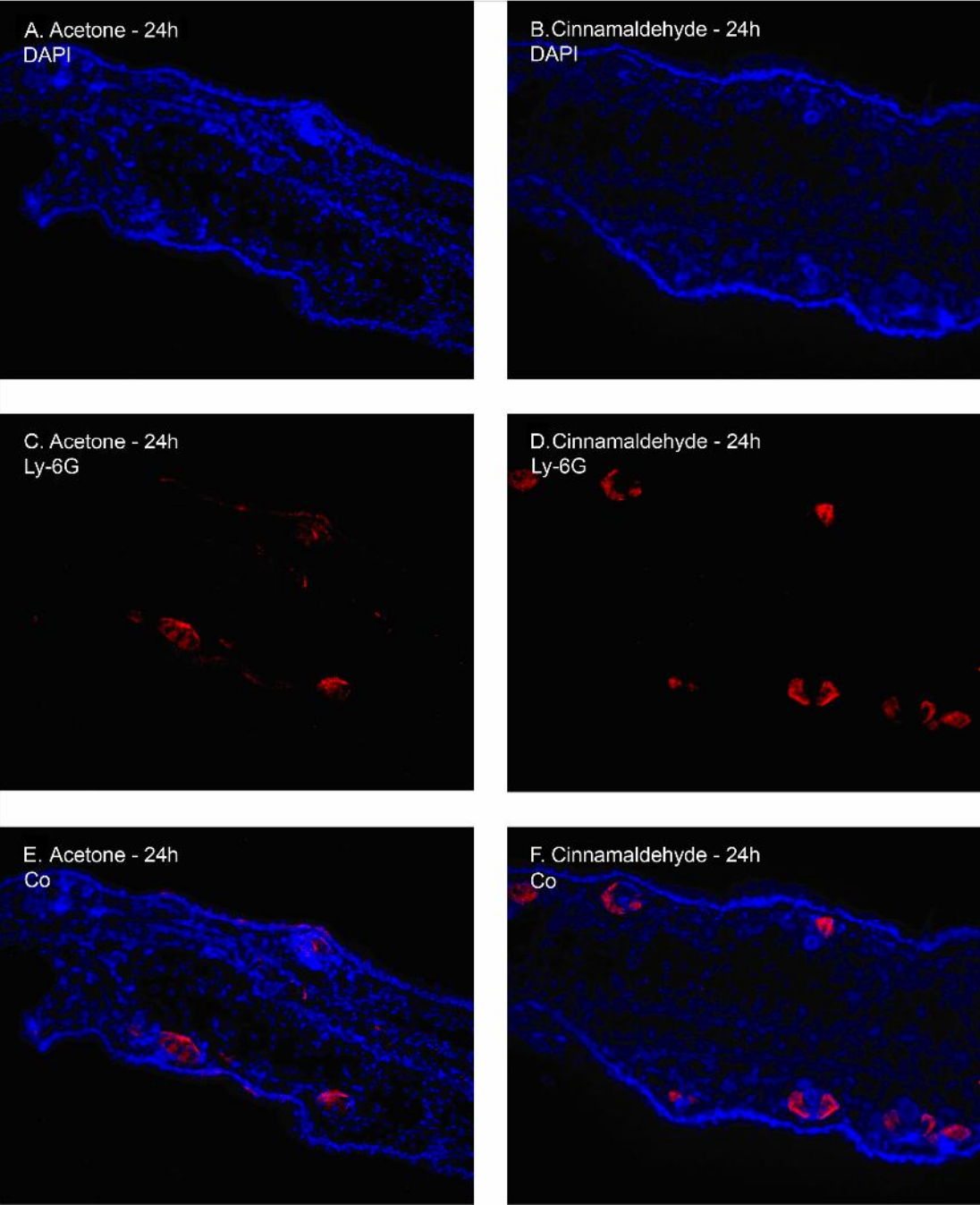


**Figure 6. Myeloperoxidase activity following TRP activation.** Myeloperoxidase activity values in cinnamaldehyde (A), capsaicin (C) and AITC (D) treated mouse ears in comparison with acetone-treated ears determined at 6, 12 and 24 h after treatment. (B) Myeloperoxidase activity in ear tissues pre-treated with acetone (20  $\mu$ l/ear), HC030031 (100 nmol/ear), camphor (300 nmol/ear), ruthenium red (RR) (300 nmol/ear), SB366791 (100 nmol/ear) or aprepitant (100 nmol/ear) 15 min before treatment with cinnamaldehyde (4  $\mu$ g/ear). Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 6 animals. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. acetone control. ### $P < 0.001$  vs. acetone plus cinnamaldehyde treatment.



**Figure 7. The representative light microphotograph of cinnamaldehyde-induced edema in mouse ear.** A thin section was obtained from ear tissue after the application of acetone (20  $\mu$ l/ear) or cinnamaldehyde (4  $\mu$ g/ear) (hematoxylin-eosin staining) in different times. (A) acetone 0,5h; (B) cinnamaldehyde 0,5h; (C) acetone 6h; (D) cinnamaldehyde 6h; (E) acetone12h; (F) cinnamaldehyde12h; (G) acetone 24h and (H) cinnamaldehyde 24h, X 40.

Figure 8



**Figure 8. Quantification of neutrophils per field by immunohistochemistry.**

Immunofluorescent images of neutrophils after cinnamaldehyde-induced mouse ear edema. A thin section was obtained from ear tissue 24 h after the application of acetone (20  $\mu$ l/ear; A, C, E) or cinnamaldehyde (4  $\mu$ g/ear; B, D, F), X 100. These sections were labeled for DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) (blue; A and B) or Ly-6G, a marker of neutrophil infiltration (red; C and D), and visualized to confocal microscopy to determine colocalization of the two markers (E, F). Representative graph of the number of neutrophils per field in acetone- or cinnamaldehyde-treated mouse ears determined 24 h after treatment. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. for 4 animals. \*\*\*P < 0.001 vs. acetone control (G).



---

## 6. DISCUSSÃO

Vários estudos relatam o desenvolvimento de reações de irritação da pele e respostas inflamatórias causadas por substâncias originadas de produtos naturais, como isotiocianato de alila e a capsaicina, que agem através da ativação de receptores TRP (Gábor and Razga 1992; Inoue et al. 1997). Nesse sentido, este estudo demonstrou que a aplicação tópica de cinamaldeído na orelha de camundongos causa respostas inflamatórias tais como formação de edema e infiltração leucocitária, que parecem ser dependentes da ativação do receptor TRPA1 presentes em neurônios sensoriais e em outros tipos celulares.

A dermatite de contato irritante é uma das doenças de pele mais comuns e acomete o paciente durante 30% do seu tempo de vida (Kadyk et al., 2003; Slodownik et al., 2008). Os irritantes que iniciam a dermatite podem ser compostos naturais usados em cosméticos, tais como o cinamaldeído. O cinamaldeído não produz nenhuma irritação nos seres humanos se utilizado em baixas concentrações, mas é capaz de induzir dano no tecido local e irritação severa se utilizado em concentrações mais altas que 3% e 8%, respectivamente (para a revisão veja: Bickers et al., 2005). No presente estudo, foi observado efeitos inflamatórios após aplicação tópica de cinamaldeído 5% (2 µg/orelha) que foi capaz de levar a formação de um rápido edema de orelha em camundongos. Os resultados encontrados estão de acordo com Thorne et al. (1991) que demonstraram que o cinamaldeído nas concentrações de 5 a 20% (que corresponde a concentração de 1 a 4 µg/orelha) produz resposta edematogênica na orelha de camundongos 1 h após sua aplicação.

Após comprovar a ocorrência do edema induzido pela aplicação tópica de cinamaldeído, comparamos este efeito com o edema de orelha causado por outros compostos irritantes naturais que ativam os canais TRP, como por exemplo, isotiocianato de alila e a capsaicina. A aplicação tópica de isotiocianato de alila foi mais eficaz do que o cinamaldeído ou a capsaicina em produzir edema de orelha. Por outro lado, o cinamaldeído foi tão potente quanto o isotiocianato de alila e mais potente do que a capsaicina em induzir edema. Curiosamente, estudos que aplicam agonistas dos receptores TRP *in vitro* ou através da injeção subcutânea mostraram que a capsaicina é mais potente do que o isotiocianato de alila e do que o cinamaldeído em produzir respostas nociceptivas (Andrade et al., 2006). Nos experimentos aqui descritos a aplicação sempre se deu por via tópica, o que faz com que diferenças na penetração destes compostos na pele explique as discrepâncias

entre os estudos. O tamanho molecular, o estado de ionização e a solubilidade lipídica determinam a penetração na pele, e esses fatores podem ter contribuído para a irritação causada (para a revisão veja: Bickers et al., 2005). Ainda, se sabe que após a aplicação tópica de cinamaldeído sua penetração na pele é de aproximadamente 55%, enquanto que a da capsaicina é de apenas 5% (para a revisão ver: Bickers et al., 2005; Kasting et al., 1997). Além disso, o isotiocianato de alila foi mais efetivo do que o cinamaldeído em produzir edema. Outro fator que pode ter contribuído para este resultado é o fato do cinamaldeído ser considerado mais seletivo do que o isotiocianato em ativar o receptor TRPA1 (Bandell et al., 2004).

Além do edema, a infiltração leucocitária é outra característica presente na dermatite de contato irritante. Nós demonstramos que o cinamaldeído, o isotiocianato de alila e a capsaicina não apenas induzem edema de orelha, mas também promovem infiltração leucocitária após aplicação tópica. Nossos resultados estão de acordo com os estudos prévios onde o isotiocianato de alila aumentou a atividade da MPO em tecido obtido de orelhas de camundongo (Bánvolgyi et al., 2004). Após 6, 12 e 24 h da aplicação do cinamaldeído, a atividade da MPO aumentou significativamente; entretanto, a aplicação de isotiocianato de alila e capsaicina apenas aumentaram a atividade da enzima MPO após 6 e 12 h e 6 h, respectivamente. A infiltração leucocitária foi confirmada pela análise histológica e imunohistoquímica, demonstrando que ocorreu infiltração de leucócitos até 24 h após o tratamento tópico com cinamaldeído. A atividade da MPO foi avaliada 30 minutos após a aplicação do cinamaldeído (pico do edema), mas nenhum aumento significativo na atividade dessa enzima ou alteração do infiltrado nas amostras histológicas foi observado neste tempo, demonstrando que a primeira fase do edema não apresenta infiltração leucocitária.

As respostas inflamatórias induzidas pelo cinamaldeído, similares a do isotiocianato de alila e da capsaicina, parecem ser mediadas pela ativação do receptor TRP. Esse fato foi confirmado pela habilidade do RR, um antagonista não seletivo dos canais TRP, de prevenir o efeito edematogênico das três substâncias. Mais seletivamente, os antagonistas do receptor TRPA1 HC030031 e a cânfora, foram efetivos em inibir o edema de orelha induzido pelo cinamaldeído e pelo isotiocianato de alila, enquanto que o antagonista seletivo do receptor TRPV1, SB366791 preveniu apenas o edema induzido pela capsaicina. Além disso, o RR, o

HC030031 e a cânfora, mas não o SB366791, reduziram o aumento da atividade da MPO induzido pelo cinamaldeído. Esses resultados indicam que a ativação do receptor TRP, mais especificamente a estimulação do TRPA1, é importante para a ocorrência das respostas inflamatórias induzidas pela aplicação tópica de cinamaldeído.

A ativação do receptor TRPA1 pode iniciar um processo conhecido como inflamação neurogênica, caracterizada pela liberação de neuropeptídeos de neurônios sensoriais aferentes e com subseqüentes respostas vasculares. Estes neuropeptídeos incluem a SP que age preferencialmente via receptor para taquicininas NK<sub>1</sub>, localizado nas terminações nervosas sensoriais cutâneas, ou em células da pele, como os queratinócitos (Inoue et al., 1997; Scholzen et al., 1998; Peters et al., 2006). A inervação cutânea parece estar alterada em um grande número de doenças inflamatórias da pele, incluindo a dermatite, onde há um aumento de SP nas terminações nervosas periféricas da pele (para revisão ver: Peter et al., 2006). O edema de orelha induzido pela aplicação de cinamaldeído e o influxo de leucócitos foram prevenidos pelo pré-tratamento dos animais com o antagonista seletivo do receptor NK<sub>1</sub> aprepitant, sugerindo, assim, que a liberação de substância P está envolvida na resposta inflamatória induzida pelo cinamaldeído.

Além do processo inflamatório, a ativação TRP pode levar a ocorrência de outros fenômenos, como a sensibilização ou a dessensibilização dos mesmos (Szallasi and Blumberg, 1999; Akopian et al., 2007; Ruparel et al., 2008; Karashima et al., 2008). Sendo assim, avaliamos a capacidade do cinamaldeído de causar sensibilização ou dessensibilização dos receptores TRP através da observação de uma única administração do cinamaldeído no dia 8, após pré-tratar os animais nos dias 1, 3 e 7. A sensibilização é o fenômeno no qual a estimulação repetida produz um aumento na resposta normalmente observada, enquanto que a dessensibilização é definida pela diminuição do efeito após administrações repetidas ou após uma única administração de uma alta dose (Akopian et al., 2007). Aqui, foi demonstrado que não houve alteração na intensidade do edema induzido pelo cinamaldeído em nenhum dos dias de tratamento, indicando que não houve processo de sensibilização ou dessensibilização após a aplicação tópica desse agonista TRPA1. Nosso resultado está de acordo com estudos anteriores que demonstraram que o cinamaldeído é pouco efetivo em causar sensibilização após sua aplicação tópica em voluntários humanos (para revisão ver: Bickers et al., 2005). Parecido com o

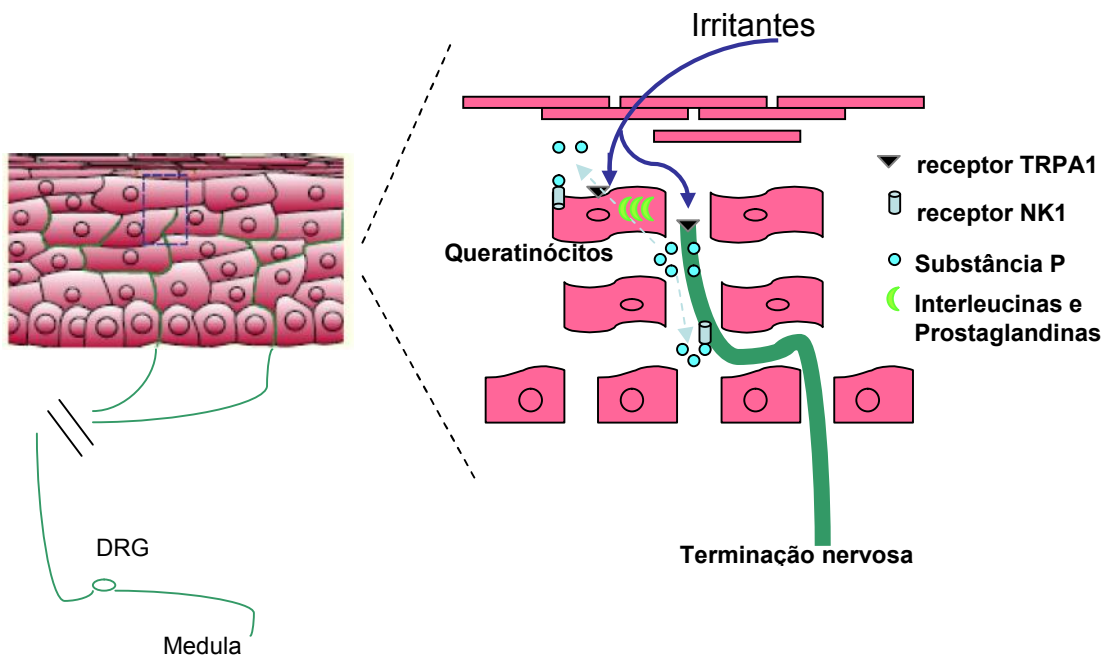
efeito observado com o cinamaldeído, Inoue et al., (1997) demonstraram que o extravasamento plasmático induzido após reaplicação de isotiocianato de alila nos dias 1, 3 e 7 não foi diferente daquele ocorrido na aplicação inicial. Adicionalmente, Dunham et al., 2008 não encontrou sensibilização ou dessensibilização após estimulação a cada 5 minutos com cinamaldeído para promover ativação de fibras aferentes primárias em ratos. Por outro lado outros estudos detectaram dessensibilização induzida pela aplicação de isotiocianato de alila a cada 3 ou 20 minutos, pela observação da diminuição de correntes de  $Ca^{++}$  e liberação de neuropeptídeos na pele de ratos, além da diminuição na resposta nociceptiva desses animais (Akopian et al., 2007; Ruparel et al., 2008). Assim, sugerimos que a capacidade dos agonistas TRPA1 de induzirem processos de dessensibilização depende do desenho experimental utilizado, o que inclui o intervalo entre a aplicação dos agonistas.

Estudos anteriores demonstram que a aplicação tópica repetida de capsaicina leva à dessensibilização funcional de um grupo de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, também chamadas de fibras sensoriais sensíveis a capsaicina (Jancsó et al. 1967; Inoue et al. 1995, Szallasi et al., 1999). O receptor TRPA1 é co-expresso com o receptor TRPV1 nesta subpopulação de neurônios sensoriais (Story et al., 2003; Obata et al., 2005; Ruparel et al., 2008). Como esperado, o pré-tratamento com a capsaicina aboliu sua resposta edematogênica, confirmando o processo de dessensibilização. Além disso, o pré-tratamento com capsaicina diminuiu, mas não extinguiu a resposta edematogênica do cinamaldeído. Desta forma parece haver um relevante, mas não essencial envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina no edema induzido pelo cinamaldeído. No mesmo sentido, a redução do edema induzido pela capsaicina causada pelo pré-tratamento com cinamaldeído está de acordo com outros estudos que têm demonstrado que um agonista TRPA1 pode levar a dessensibilização funcional de sistemas sensoriais incluindo algumas das fibras sensíveis a capsaicina devido à intensa interação entre os receptores TRPA1 e TRPV1 nessas fibras (Akopian et al., 2007). De fato, há processos de dessensibilização heteróloga entre a capsaicina e o isotiocianato de alila que afeta várias respostas mediadas por tais substâncias (Akopian et al., 2007; Ruparel et al., 2008).

A dessensibilização do canal TRP pode envolver caminhos diferentes dependentes ou não de alterações nas concentrações de  $Ca^{++}$  intracelular (Abe et

al., 2006; Nilius et al., 2006; Akopian et al., 2007; Ruparel et al., 2008). Nós observamos que a expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 não sofreu alterações após a aplicação repetida de capsaicina ou cinamaldeído, quando comparados ao grupo que recebeu acetona. Estes achados nos permitem sugerir o envolvimento de outro mecanismo celular como fosforilação, internalização ou dependência de  $Ca^{++}$  na dessensibilização provocada pelo cinamaldeído. O fato da dessensibilização heteróloga provocada pelos agonistas TRPA1 e TRPV1 não ser completa nos permite sugerir que há outros fatores envolvidos além dos mecanismos intracelulares, como por exemplo, a expressão destes canais em diferentes tipos celulares. De fato, recentemente foi demonstrado que o receptor TRPA1 está expresso em neurônios sensoriais que não expressam o receptor TRPV1 e em outros tipos celulares como células da pele, os queratinócitos (Atoyán et al. 2009; Birö e Kovács 2009; Denda et al., 2010). Assim, algumas respostas inflamatórias provocadas pelo cinamaldeído parecem estar ocorrendo através da ativação do receptor TRPA1 em neurônios sensoriais, onde ele pode estar inclusive agindo por dessensibilizar a fibra; e outras respostas ocorram em receptores TRPA1 expressos em outros tipos celulares. Por este motivo, a aplicação repetida de cinamaldeído seja capaz de diminuir o edema induzido pela posterior aplicação de capsaicina (dessensibilização) e ao mesmo tempo não provoque alterações significativas na resposta do próprio cinamaldeído, provavelmente compensadas pela ativação TRPA1 de queratinócitos.

Desta maneira, sugerimos que o cinamaldeído poderia estar agindo de duas maneiras (Figura 7): a primeira seria pela ativação de receptores TRPA1 expressos em neurônios sensoriais aferentes cutâneos, que levaria a liberação de neuropeptídeos como a substância P. Esse neuropeptídeo, após liberado, poderia se ligar em receptores  $NK_1$  expressos nestes neurônios ou em queratinócitos iniciando a inflamação neurogênica. A segunda via seria pela ativação dos receptores TRPA1 expressos em queratinócitos, o que levaria a subsequente liberação de interleucinas e prostaglandinas pro-inflamatórias. Por este motivo talvez, que a inibição do edema e da atividade da enzima MPO pelo aprepitant tenha sido parcial ( $36\pm 9\%$  e  $26\pm 9\%$ , respectivamente). Assim, a maior parte do efeito inflamatório induzido pelo cinamaldeído pode estar ocorrendo via ativação do receptor TRPA1 em queratinócitos.



**Figura 7.** Ativação do receptor TRPA1 após aplicação tópica de cinamaldeído. Diferentes estímulos podem levar a ativação do receptor TRPA1 expresso em terminações nervosas sensoriais ou células não neuronais, como os queratinócitos. A figura demonstra a ativação do TRPA1 provocada pela aplicação tópica de cinamaldeído. Após ativados, os receptores TRPA1 expressos em terminações nervosas sensoriais cutâneas podem levar a liberação de neuropeptídeos, e estes neuropeptídeos vão ativar seus receptores alvos expressos nas terminações ou em células não neuronais. Ainda, a ativação pode se dar em receptores TRPA1 expressos nos queratinócitos, causando a liberação de interleucinas e prostaglandinas pró-inflamatórias.

---

## **7. CONCLUSÃO**



### **Conclusão Geral**

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que o cinamaldeído é capaz de induzir respostas inflamatórias como edema e infiltração leucocitária quando aplicado topicamente em camundognos. Estes efeitos parecem ser mediados pela ativação de receptores TRPA1 localizados em neurônios sensoriais e em outros tipos celulares, como em queratinócitos.

---

## **8. REFERÊNCIAS**

- Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol* 2007; 583: 175-93.
- Andrade EL, Ferreira J, André E, Calixto JB. Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. *Biochem Pharmacol* 2006; 28: 104-14.
- Andre, E.; Campi, B.; Materazzi, S.; Trevisani, M.; Amadesi, S.; Massi, D.; Creminon, C.; Vaksman, N.; Nassini, R.; Civelli, M.; Baraldi, P. G.; Poole, D. P.; Bunnett, N. W.; Geppetti, P.; Patacchini, R. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 2574–2582.
- Appendino G.; Minassi A.; Pagani A.; Ech-Chahad A. The role of natural products in the ligand deorphanization of TRP channels. *Curr Pharm Des.* 2008; 14: 2-17.
- Atoyan R, Shander D, Botchkareva NV. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Investig Dermatol* 2009; 129: 2312-15.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004; 41: 849-57.
- Bánvolgyi A, Pozsgai G, Brain S, Helyes Z, Szolcsa J, Ghosh M, Meleghe B, Pintéra E. Mustard oil induces a transient receptor potential vanilloid 1 receptor-independent neurogenic inflammation and a non-neurogenic cellular inflammatory component in mice. *Neuroscienc* 2004; 125: 449–59.
- Baraldi PG, Preti D, Materazzi S, Geppetti P. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents. *J Med Chem.* 2010; 53:5085-107.
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature.* 2007; 448: 204-8.
- Bickers D, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, Sipes IG, Smith RL, Tagami H. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43: 799-836.

- Birô T, Kovács L. An “Ice-Cold” TR(i)P to Skin Biology: The Role of TRPA1 in Human Epidermal Keratinocytes. *J Investig Dermatol* 2009; 129: 2096–99.
- Bíró T, Tóth BI, Marincsák R, Dobrosi N, Géczy T, Paus R. TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772: 1004-21.
- Bruze M, Johansen JD, Andersen KE, Frosch P, Lepoittevin JP, Rastogi S, Wakelin S, White I, Menné T. Deodorants: an experimental provocation study with cinnamic aldehyde. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 48: 194-200.
- Calixto JB, Kassuya CA, André E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Therapeut* 2005; 106: 179-208.
- Caspani O, Heppenstall PA. TRPA1 and Cold Transduction: An Unresolved Issue? *J Gen Physiol* 2009; 133: 245-49.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816-24.
- Cocchiara J, Letizia CS, Lalko J, Lapczynski A, Api AM. Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 867–923.
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Geleo GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 2004; 432: 723–30.
- Cosens DJ and Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant, *Nature*. 1969; 224:285–287.
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K: Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 285: 1250–1252.

- Dunham JP, Kelly S, Donaldson LF. Inflammation reduces mechanical thresholds in a population of transient receptor potential channel A1-expressing nociceptors in the rat. *Eur J Neurosci.* 2008; 27: 3151-60.
- Dunham JP, Leith JL, Lumb BM, Donaldson LF. Transient receptor potential channel A1 and noxious cold responses in rat cutaneous nociceptors. *Neuroscience.* 2010; 165:1412-9.
- Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin).* 2008; 2: 429-38.
- Fyhrquist-Vanni N, Alenius H, Lauerma A. Contact dermatitis. *Dermatol Clin.* 2007; 25:613-23.
- Gábor M, Ra'zga Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. *Agents Actions.* 1992; 36: 83–6.
- Gaudet R. Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments. *J Gen Physiol.* 2009; 133: 231-7.
- Guo JY, Huo HR, Zhao BS, Liu HB, Li LF, Ma YY, Guo SY, Jiang TL. Cinnamaldehyde reduces IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 activity in rat cerebral microvascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2006; 537: 174-80.
- Grant AD, Pinter E, Salmon AM, Brain SD. An examination of neurogenic mechanisms involved in mustard oil-induced inflammation in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 2005; 507: 273–80.
- Hinman, A. C.; Chuang, H.-h.; Bautista, D. M.; Julius, D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103: 19564–19568.
- Inoue H, Nagata N, Koshihara Y. Involvement of substance P as a mediator in capsaicin-induced mouse ear oedema. *Inflamm Res.* 1995; 44: 470-4.
- Inoue H, Asaka T, Nagata N, Koshihara, Y. Mechanism of mustard oil-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 1997; 333: 231-40.

- Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1999; 274: 7325-33.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. 2004; 427: 260-5.
- Kadyk DL, McCarter K, Achen F, Belsito DV. Quality of life in patients with allergic contact dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 49 (6): 1037–48.
- Karashima Y, Prenen J, Meseguer V, Owsianik G, Voets T, Nilius B. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. *Pflugers Arch*. 2008; 457: 77-89.
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:1273-8.
- Kasting GB, Francis WR, Bowman, LA, Kinnett GO. Percutaneous absorption of vanilloids: in vivo and in vitro studies. *J Pharm Sci*. 1997; 86: 142-6.
- Kim DK, Lillehoj HS, Lee SH, Jang SI, Bravo D. High-throughput gene expression analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral feeding of carvacrol, cinnamaldehyde, or Capsicum oleoresin. *Poult Sci*. 2010; 89: 68-81.
- Lahti A, Maibach HI. An animal model for nonimmunologic contact urticaria. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984; 76: 219-24.
- Lahti A, McDonald DM, Tammi R, Maibach HI. Pharmacological studies on nonimmunologic contact urticaria in guinea pigs. *Arch Dermatol Res*. 1986; 279: 44-9.
- Latorre R, Zaelzer C, Brauchi S. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q Rev Biophys*. 2009; 42: 201-46.
- Lee H, Caterina M. TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Pflugers Archiv - Eur J Physiol*. 2005; 451: 160-7.

- Lee, G., Abdi, K., Jiang, Y., Michaely, P., Bennett, V., Marszalek, PE. Nanospring behaviour of ankyrin repeats. *Nature*. 2006, 440: 246–249.
- Lumpkin EA, Caterina MJ. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*. 2007; 445: 858-65.
- Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol*. 2005; 15: 929-34.
- Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosc*. 2006; 32: 335-43.
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 2007; 445: 541-5.
- Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 8784-9.
- Montell C and Rubin CG. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction, *Neuron*. 1989; 2: 1313–1323.
- Nilius B, Voets T, Peters J. TRP channels in disease. *Science's STKE*. 2005; 295: 1-9.
- Nilius B. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 2007; 162: 244-53.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*. 2007; 87: 165-217.
- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2393-401.

- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: An overview. *Cell Calcium*. 2005; 38: 233-52.
- Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, Paus R, Scholzen TE. Neuropeptide Control Mechanisms in Cutaneous Biology: Physiological and Clinical Significance. *J Investig Dermatol*. 2006; 126: 1937-47.
- Petersen CCH, Berridge MJ, Borgese MF, Bennett DL. Putative capacitative calcium entry channels: Expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues, *Bioche. J*. 1995; 311: 41–44.
- Phillips AM, Bull A, Kelly LE. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron*. 1992; 8: 631-42.
- Ruparel NB, Patwardhan AM, Akopian AN, Hargreaves KM. Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. *Pain*. 2008; 135: 271–9.
- Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol*. 1998; 7: 81–96.
- Slodownik D, Lee A, Nixon R. Irritant contact dermatitis: A review. *Australas J Dermatol* 2008; 49: 1–11.
- Schmidt M, Dubin AE, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron*. 2009; 64: 498-509.
- Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol*. 2003; 139: 1479–88.
- Stokes A, Wakano C, Koblan-Huberson M, Adra CN, Fleig A, Turner H. TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cell Signal*. 2006; 18: 1584-94.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan, S.,



- Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003; 112: 819-29.
- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*. 2001; 29: 645-55.
- Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999; 51: 159-212.
- Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6: 357-72.
- Thorne PS, Hawk C, Kaliszewski SD, Guiney PD. The noninvasive mouse ear swelling assay. II. Testing the contact sensitizing potency of fragrances. *Fundam Appl Toxicol*. 1991, 17: 807- 20.
- Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, 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 USA*. 2007; 104: 13519-24.
- Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci*. 2005; 25: 8924–37.
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1995; 92: 9652–9656.
- Weibel H, Hansen J. Interaction of cinnamaldehyde (a sensitizer in fragrance) with protein. *Contact Dermatitis*. 1989; 20: 161-6.
- Zegarska B., Lelinska A., Tyrakowski T., Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep*. 2006; 58: 13-21.