

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA GONZAGA SANTOS



**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NOS EFEITOS
FARMACOLÓGICOS CAUSADOS PELO TRANS-ANETOL**

CURITIBA

2018

LARISSA GONZAGA SANTOS

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NOS EFEITOS
FARMACOLÓGICOS CAUSADOS PELO TRANS-ANETOL**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice André
Co-orientadora: Janiana Raiza Jentsch
Matias de Oliveira

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus

À Prof^a. Dr^a. Eunice André pela orientação, ensinamentos, paciência e amizade ao longo desses 4 anos de iniciação científica;

À minha família por tudo, principalmente pelo incentivo e investimento na minha educação, todas as minhas conquistas sempre vão refletir tudo o que fizeram por mim;

Ao Kiataki pelo amor, companheirismo, apoio, paciência e incentivo a sempre buscar a realização dos meus objetivos;

À todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação;

Aos meus amigos de graduação, principalmente Aléxia, Carol, Gus e Ju pela amizade, parceria nos estudos e por tornar minhas manhãs mais felizes;

À Jani por me receber tão bem no laboratório, sempre disposta a me ajudar e ensinar;

Ao Vitor pela companhia no laboratório, auxílio no experimentos e pelas (muitas) risadas;

Aos funcionários do biotério, por sempre estarem dispostos a me ajudar;

Aos animais que doaram a vida para realização deste estudo;

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

“A educação é a arma mais poderosa
que você pode usar para mudar o mundo”

Nelson Mandela

RESUMO

O Trans-anetol é o principal constituinte do óleo essencial de algumas plantas aromáticas. Estudos mostram que o anetol apresenta propriedades antifúngicas, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva. O exato mecanismo envolvido nesses efeitos ainda não está completamente elucidado. Muitos compostos isolados de plantas como mentol, cinamaldeído, capsaicina, dentre outros, que apresentam fragrância agradável, sabor picante ou adocicado foram descobertos como alvos de receptores de potencial transitório (TRPs). Com isso, o objetivo foi investigar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 nos efeitos farmacológicos produzidos pelo trans-anetol. O efeito nociceptivo foi avaliado aplicando, em camundongos, uma injeção intraplantar do composto em diferentes doses (100 nmol, 250 nmol e 500 nmol/20 μ L/pata). Logo após a injeção, o tempo gasto pelo animal lambendo ou mordendo a pata foi avaliado durante 20 minutos. Para analisar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1, os antagonistas destes receptores, capsazepina (10 nmol e 30 nmol/20 μ L/ pata) e HC030031 (100 μ g/20 μ L/pata) respectivamente, foram co-injetados com o anetol. O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de anetol em diferentes concentrações (200 mM, 500 mM e 1000 mM/20 μ L/orelha). A fim de avaliar o envolvimento do receptor TRPA1 na resposta edematogênica, animais foram pré tratados 15 minutos antes da aplicação de anetol (500 mM/20 μ L/orelha) com HC030031 (300 nmol/20 μ L/orelha). Com propósito de investigar se repetidas aplicações de anetol, alil isotiocianato ou capsaicina causaria dessensibilização para o efeito edematogênico, a orelha de camundongos foi tratada topicamente no 1º e 3º dia com anetol (500 mM/20 μ L/orelha), capsaicina (200 μ g/20 μ L/orelha) ou alil (1 M/20 μ L/orelha). Foi observado que o anetol, nas doses de 250 nmol e 500 nmol/20 μ L, promove nocicepção (22,5 \pm 5,3 s e 47,8 \pm 11,9 s, respectivamente). O antagonista do receptor TRPA1 foi capaz de abolir essa resposta nociceptiva (96,2 \pm 2%). Contudo, a capsazepina, em as ambas doses testadas, não inibiu a nocicepção induzida pelo anetol. A aplicação tópica de anetol na orelha de camundongos foi capaz de induzir a formação de edema em todas doses testadas (0,032 \pm 0,005 mm, 0,118 \pm 0,01 mm, 0,128 \pm 0,027 mm, respectivamente) quando comparado ao seu veículo (0,007 \pm 0,005 mm). Os animais que foram pré tratados com HC030031 apresentaram uma inibição da resposta edematogênica (44,6 \pm 9,9%). Em orelhas pré-tratadas com anetol no 1º dia, a resposta edematogênica no 3º dia induzida pelo anetol, pela capsaicina ou pelo alil foi reduzida em aproximadamente 69,2 \pm 7,7%, 50 \pm 3,3% e 37,5 \pm 7,8%, respectivamente. Os animais que foram pré-tratados no 1º dia com a capsaicina também apresentaram inibição do edema induzido pela capsaicina ou anetol (60 \pm 9,7%, 94,9 \pm 3,4%, respectivamente). E por fim, os camundongos tratados no dia 1 com alil, apresentaram no dia 3 redução de 36,9 \pm 11,9% e 51,2 \pm 7,4% do edema causado pelo alil e anetol, respectivamente. Desta forma, o receptor TRPA1 parece estar envolvido na resposta nociceptiva e edematogênica promovida pelo anetol. Além disso, a resposta antiedematogênica induzida por este composto ocorre, possivelmente, por dessensibilização, respectivamente, de neurônios sensoriais que expressam TRPs.

Palavras-chave: trans-anetol; TRPV1; TRPA1.

ABSTRACT

Trans-anethole is a substance naturally found in anise, star anise and fennel essential oils. Several studies have shown that anethole may present antifungal, antibacterial, anti-inflammatory and antinociceptive properties but the responsible mechanisms for these effects are still unclear. Many plant-isolated compounds that have sweet or spicy taste have been discovered to be targets for Transient Receptor Potential channels (TRPs). Considering these similarities, we hypothesized that TRPV1 and TRPA1 could be involved in the pharmacologic actions of anethole. The nociceptive response, ear edema as well as sensitization/desensitization process after topical application of anethole or capsaicin in mice was analyzed. The nociceptive behavior was evaluated during 20 minutes after intraplantar injection (100, 250 and 500 nmol/20 μ l/paw) of anethole. Additional experiments involved intraplantar treatment with TRPA1 or TRPV1 antagonist, HC-030031 (300 μ g/20 μ l/paw) or capsazepine (10 nmol and 30 nmol/20 μ l/paw). The ear edema was induced by anethole (200, 500 and 1000 mM/20 μ l/ear) topical application, and the measures were made after 30, 60, 90 and 120 minutes. We also investigated whether repeated ear exposure to anethole or capsaicin could induce the sensitization/desensitization process to its edematogenic effect. Thus, mouse ears were topically pretreated on days 1 and 3 with anethole (500 mM/20 μ l/ear) or capsaicin (200 μ g/20 μ l/ear) in separate groups. After 3 days, the animals in each group were challenged with anethole (500 mM/20 μ l/ear) or capsaicin (200 μ g/20 μ l/ear) and the development of edema was assessed. The same protocol was repeated with allyl isothiocyanate. The intraplantar injection of anethole promoted nociception (22.5 ± 5.3 s and 47.8 ± 11.9 s) only in the higher doses (250 and 500 nmol/20 μ L, respectively) as compared to vehicle (0.8 ± 0.2 s). The HC030031 administration was able to reduce this response by $96.2 \pm 2\%$. Topical application of anethole (all doses tested) induced edematogenic response (0.032 ± 0.005 mm, 0.118 ± 0.01 mm, 0.128 ± 0.027 mm, respectively), compared to vehicle (0.007 ± 0.005 mm). In ears pre-treated with anethole on days 1, the edematogenic response of anethole, capsaicin or allyl isothiocyanate on day 3 was significantly inhibited ($69.2 \pm 7.7\%$, $50 \pm 3.3\%$, $37.5 \pm 7.8\%$ of reduction, respectively). In addition, pretreatment with capsaicin on day 1 also reduced the edema evoked by capsaicin or anethole on day 3 ($60 \pm 9.7\%$, $94.9 \pm 3.4\%$ of reduction, respectively). In the same way, allyl isothiocyanate was able to inhibit allyl or anethole induced edema on day 3, by $36.9 \pm 11.9\%$ and $51.2 \pm 7.4\%$, respectively. Anethole promotes nociception response, at least, by TRPA1 activation. The edematogenic and anti-edematogenic response induced by anethole appear to occur by activation and desensitization, respectively, of TRP-expressing sensory neurons.

Key-words: trans-anethole; TRPA1; TRPV1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 JUSTIFICATIVA	8
1.2 OBJETIVOS	9
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 TRANS-ANETOL.....	10
2.2 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO	11
2.2.1 TRPV1.....	13
2.2.2 TRPA1	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 ANIMAIS	18
3.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL	18
3.3 ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL.....	19
3.4 RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL	19
3.5 ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO TRANS ANETOL	19
3.6 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA REPETIDA DE TRANS-ANETOL	20
3.7 DESSENSIBILIZAÇÃO CRUZADA	20
3.8 HISTOLOGIA	21
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4. RESULTADOS	22
4.1 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL	22
4.2 ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL.....	22
4.3 RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL	23
4.4 ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL.....	24
4.5 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA REPETIDA DE TRANS-ANETOL	25
4.6 DESSENSIBILIZAÇÃO CRUZADA	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

O trans-anetol é um composto aromático, presente no óleo essencial de plantas como a erva doce, o anis estrelado e o elemi. Estudos realizados, confirmam que este composto promove efeitos benéficos e terapêuticos por apresentar atividade anti-inflamatória, antibacteriana, gastroprotetora, dentre outras (Freire et al. 2005; Yang et al., 2010). Contudo, o exato mecanismo pelo qual o anetol produz seus efeitos ainda não foi elucidado.

Interessantemente, muitos compostos isolados de plantas como mentol, cânfora, cinamaldeído, capsaicina, dentre outros, que também apresentam fragrância agradável, sabor picante ou adocicado foram descobertas como sendo alvos de canais iônicos conhecidos como receptores de potencial transitório (TRPs) (Calixto et al. 2005). Estes receptores TRPs, como o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e o receptor de potencial transitório do tipo anquirina 1 (TRPA1) estão expressos em fibras sensorias e são capazes de modular funções celulares, e adicionalmente, atuar como integradores moleculares para vários estímulos nocivos (Mandadi & Roufogalis, 2008).

Por atuar como integrador molecular de estímulos nocivos, seu envolvimento em várias patologias vem sendo bastante estudado nos últimos anos. De fato, estudos evidenciaram que os receptores TRPV1 e TRPA1 parecem ser alvos relevantes em várias condições patológicas como na dor de origem inflamatória e neuropática, na hiperalgesia térmica e mecânica associadas a processos inflamatórios e dano tecidual, dermatite de contato alérgica, dentre outros (Obata et al., 2005; Grava et al., 2010; Yun et al., 2011; Palazzo et al., 2012). Logo, tendo em vista o papel desses receptores como iniciadores e integradores de estímulos nocivos é pertinente que as próximas terapias farmacológicas apontem para esses receptores como novos alvos terapêuticos.

A descoberta de novos agonistas TRPs é de importância farmacológica, pois sabe-se que a ativação constante dos receptores de potencial transitório por seus agonistas pode levar a dessensibilização das fibras sensoriais primárias, diminuindo a sensibilidade do indivíduo a estímulos dolorosos. Logo

uma molécula irritante pode paradoxalmente causar analgesia (Jancsó & Jancsó-Gabor, 1949).

Sendo assim, é interessante notar que tanto a dessensibilização desses receptores por ação de agonistas, bem como o seu bloqueio por ação de antagonistas pode ser um alvo farmacológico para o tratamento de algumas patologias nas quais estes receptores estão envolvidos. Seguindo este raciocínio e tendo em vista que a identificação de compostos naturais pode conduzir ao desenvolvimento de novas drogas para prevenção e tratamento de diversas patologias, a presente proposta de estudo teve como principal objetivo investigar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 nos efeitos farmacológicos produzidos pelo trans-anetol.

1.1 JUSTIFICATIVA

A regulação da atividade de receptores TRPs, seja pelo bloqueio ou por dessensibilização farmacológica, tem sido considerado de grande importância no controle de vários processos patológicos nos quais se observa o envolvimento desses receptores. Sendo assim, é interessante notar que tanto a dessensibilização desses receptores por ação de agonistas, bem como o seu bloqueio por ação de antagonistas pode ser um alvo farmacológico para o tratamento de algumas patologias nas quais estes receptores estão envolvidos, tais como dor, hipereflexia de bexiga, processos inflamatórios, problemas respiratórios, etc. Seguindo este raciocínio e tendo em vista que a identificação de compostos naturais podem conduzir ao desenvolvimento de novas drogas para prevenção e tratamento de diversas patologias, a presente proposta de estudo tem como principal objetivo investigar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 nos efeitos farmacológicos produzidos pelo trans-anetol.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente projeto é estudar o envolvimento dos receptores TRPV1 e TRPA1 nos efeitos promovidos pelo trans-anetol, através de técnicas farmacológicas *in vivo*.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se diferentes tratamentos com trans-anetol causam efeitos nociceptivos ou antinociceptivos em camundongos e se esses efeitos são modulados por receptores TRPV1 ou TRPA1;
- Analisar se o tratamento tópico com trans-anetol promove efeitos edematogênicos ou anti-edematogênicos e se estas respostas são mediadas pelos receptores TRPV1 ou TRPA1;
- Caracterizar a participação de fibras sensoriais primárias, expressando TRPV1 e TRPA1, nos efeitos promovidos pelo trans-anetol;
- Investigar se a aplicação tópica de trans-anetol causa sensibilização/dessensibilização dos receptores TRPV1 ou TRPA1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANS-ANETOL

O trans-anetol, 1-metoxi-4-(1-propenil) benzeno, é um monoterpene derivado do aminoácido fenilalanina (Figura 1). Ele é um composto aromático, de sabor adocicado, sendo utilizado amplamente na indústria para realçar o sabor de comidas e bebidas alcoólicas, como doces e vinhos, e como componente na fabricação de perfumes e cosméticos (Soares et al. 2007). Esta substância é encontrada naturalmente no óleo essencial de diversas plantas como a *Illicium verum* Hook, conhecida como Anis estrelado, *Foeniculum vulgare*, conhecida como erva-doce, e do *Canarium commune*, conhecida com Elemi (Figura 2) (Al Harbi et al. 1995).

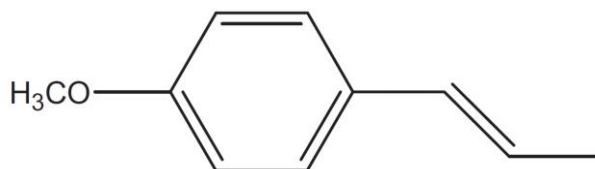


Figura 1. Estrutura química do monoterpene trans-anetol. FONTE: Rather, 2003.

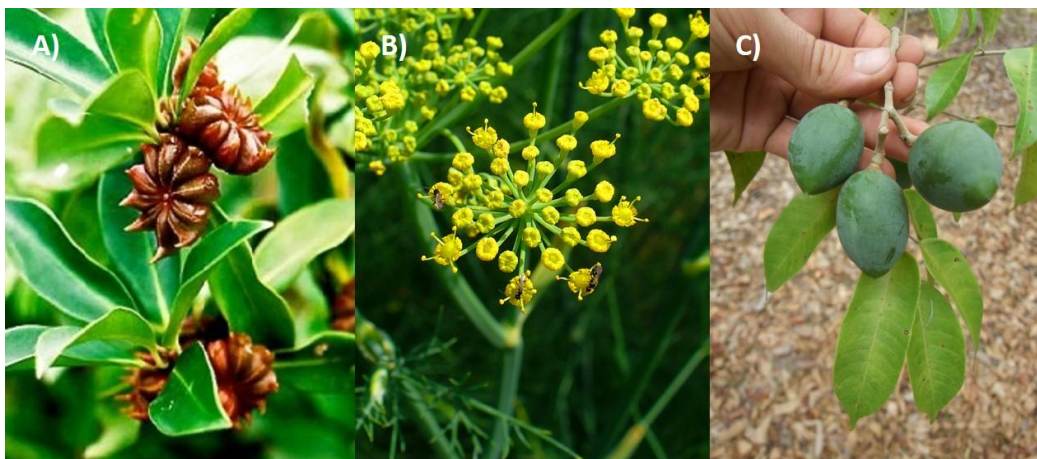


Figura 2. Plantas que apresentam trans-anetol como constituinte do óleo essencial. A) *Illicium verum* Hook; B) *Foeniculum vulgare*; C) *Canarium commune*. (FONTE: beehappyplants.co.uk).

Estas plantas são popularmente conhecidas por suas propriedades terapêuticas no tratamento de dores gastrointestinais e como expectorante. (Yang et al. 2010; Mogana & Wiart, 2011; Rather et al., 2012). Estudos realizados apontam o anetol como o principal composto responsável pelos efeitos promovidos por estas plantas medicinais, apresentando também ação

anestésica (Ghelardini et al. 2001), antioxidante (Freire et al. 2005), antibacteriana (Yang et al. 2010), antifúngica (Kosalec et al. 2005), anticarcinogênica (Al Harbi et al. 1995; Chainy et al. 2000) e anti-inflamatória (Ghelardini et al. 2001; Domiciano et al. 2011). No entanto, pouco se sabe sobre mecanismo pelo qual anetol promove suas ações farmacológicas.

O entendimento do mecanismo de ação do anetol é relevante pois propiciaria uma base para o seu uso, ou uso das plantas que apresentam este composto, no tratamento de patologias, como por exemplo, distúrbios gastrointestinais, afecções bacterianas, doenças inflamatórias e no tratamento da dor.

2.2 RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSITÓRIO

O primeiro receptor de potencial transitório (TRP) foi descoberto em 1969, por Cosen e Manning, ao estudarem uma variedade mutante de *Drosophila melanogaster*. Estas moscas, ao serem expostas a luz constante e intensa ficavam temporariamente cegas. Ao realizarem uma eletroretinograma, os pesquisadores observaram que as moscas que eram portadoras da mutação apresentavam uma resposta transitória ao estímulo luminoso, enquanto as moscas que apresentavam fenótipo normal, exibiam uma resposta contínua (Minke, 2010). Cerca de 20 anos depois, Montell e Rubin, foram capazes de clonar e sequenciar o gene *trp* da *Drosophila*, contribuindo para a caracterização molecular da proteína (Montell & Rubin, 1989). Contudo, foi apenas em 1995, que encontraram em mamíferos um canal homólogo ao TRP observado na *Drosophila* (Wes et al., 1995).

Desde então, foram descobertos 28 canais iônicos pertencentes a família dos receptores de potencial transitório. Esta superfamília é dividida em 6 principais subfamílias: TRPC (canônica), TRPV (vanilóide), TRPA (anquirina), TRPM (melastatina), TRPP (poliscistina) e TRPML (mucolipina) (Figura 3). Sendo que todos estes TRPs possuem similaridades estruturais, apresentando seis domínios transmembranas e um poro formado entre o domínio 5 e 6, por onde ocorre a passagem dos íons (Levine & Alessandri-Haber, 2007).

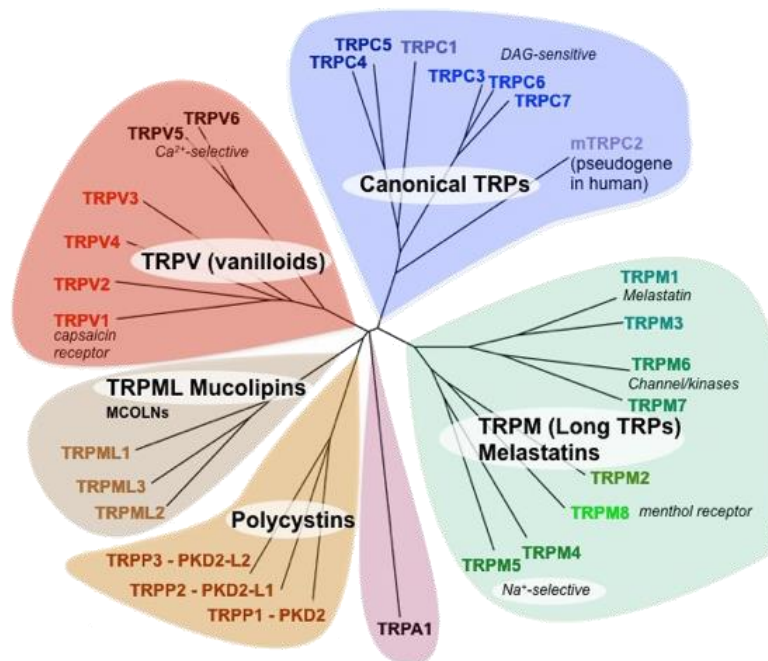


Figura 3. Superfamília dos Receptores de Potencial Transitório. FONTE: Clapham, 2003.

Estes receptores são expressos em diversos tecidos e estão envolvidos em diversas funções fisiológicas. Por serem receptores polimodais, capazes de perceber tipos variados de estímulos (químicos, térmicos e mecânicos), são considerados importantes transdutores de sinais, sendo essenciais em processos sensoriais, como o paladar e a dor (Voets et al., 2005).

Os TRPs foram apontados como a principal família de receptores envolvidos na percepção de estímulos nocivos (Patapoutian, 2009). Muitos deles estão presentes em terminações nervosas (nociceptores) que irão perceber o estímulo nocivo e transmitir esta informação, por meio das fibras aferentes primárias, ao corno dorsal da medula, que envia esta mensagem ao tálamo e em seguida ao córtex (Osterweiss et al., 1987). A ativação destes receptores nas fibras sensoriais levam ao aumento de influxo de Na^+ e Ca^{2+} através da membrana, que irá despolarizar, desencadeando o potencial de ação do neurônio (Gees et al., 2010). Desta forma, foi descoberta a participação destes receptores em processos dolorosos, como a dor de origem inflamatória e neuropática e a hiperalgesia térmica e mecânica.

Além disso, outras patologias estão associadas a ativação destes receptores. Dentre elas, estão afecções que acometem as vias respiratórias (como a asma, tosse e edema pulmonar), o trato intestinal, o sistema

cardiovascular, a pele (como a dermatite atópica) e o sistema nervoso central (para revisão ver Moran et al., 2011).

Então, devido ao envolvimento dos receptores de potencial transitório em uma ampla variedade de doenças, eles se tornaram importantes alvos farmacológicos no desenvolvimento de novas drogas.

2.2.1 TRPV1

O receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1) foi o primeiro receptor da sua subfamília (TRPV) a ser descrito (Figura 4). Estes receptores estão amplamente distribuídos pelo corpo, podendo ser encontrados em fibras sensoriais primárias, do tipo C e A- δ ; em áreas do sistema nervoso central, como no sistema límbico, tálamo, hipotálamo, cerebelo, substância nigra, dentre outros; e em células epiteliais do trato urinário, do palato e queratinócitos (Mezey et al., 2000; Birder et al., 2002; Kido et al., 2003; Inoue et al., 2002).

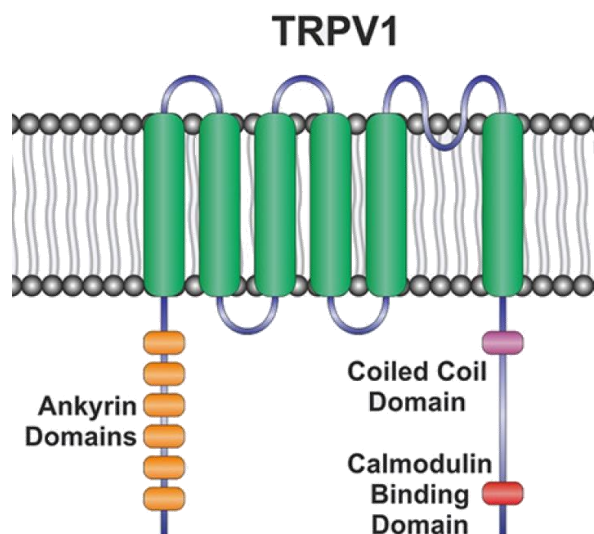


Figura 4. Estrutura do Receptor TRPV1. FONTE: Jardim et al., 2003.

O TRPV1 é considerado um termosensor, sendo ativado por temperaturas entre de 43°C e 52°C. Ele também pode ser ativado por baixo pH (< 6,5), por compostos endógenos como a anandamida e metabólitos do ácido araquidônico (LTB₄, 15-HETE, 12-HpETE), pelo veneno pungente de algumas espécies de animais como aranhas e água-vivas, e por substâncias exógenas

irritantes encontradas em muitas plantas como a capsaicina (princípio ativo presente nas espécies do gênero *Capsicum*), a resiniferatoxina (princípio ativo da *Euphorbia resinifera*), o gingerol e zingerone (componentes do gengibre) e a canfôra (extraída da árvore *Cinnamomum camphora*) (para revisão ver Moran, 2017).

A atividade deste receptor sofre complexa regulação por diversos fatores. O fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), por exemplo, se liga ao receptor TRPV1 estabilizando-o em sua conformação inativa. Já, a proteína quinase C (PKC) e o fator de crescimento do nervo (NGF) clivam a PIP₂, promovendo a ativação do receptor. A bradicinina produz esse mesmo efeito, porém indiretamente, pois induz a fosfolipase C (PLC), que hidrolisa a PIP₂, e o diacilglicerol, que ativa a PKC. Tanto a PKC, quanto a PLC também são induzidas pela ativação dos receptores ativados por proteases (PAR₂). Desta forma, agonistas do PAR₂ (como a triptase, liberada por mastócitos e outras células inflamatórias) podem levar ao aumento da atividade do TRPV1. Outro agente capaz de modular a atividade do TRPV1 é a proteína quinase dependente de Ca²⁺/Calmodulina, que fosforila este canal iônico, mantendo-o aberto (Para revisão ver Szallasi et al., 2007).

Muitos estudos realizados demonstram o aumento da expressão deste receptor em alguns quadros patológicos como, por exemplo, na hiperreflexia de bexiga, na hipersensibilidade retal, na tosse crônica e na dor associada a doenças como enxaqueca, osteoartrite e neuralgia pós-herpética (Birder, 2007; Chan et al., 2003; Groneberg et al., 2004; Meents et al., 2010; Kelly et al., 2013; Han et al., 2016). Desta forma, o bloqueio da atividade deste receptor por antagonistas, surge como uma opção de intervenção farmacológica.

Atualmente, já foram descobertos alguns antagonistas do receptor TRPV1, dentre eles a capsazepina, o SB-366791 e o AMG-517. Muitos destes compostos já chegaram ao ensaio clínico de fase II, contudo não foram aceitos pois causavam a perda da sensibilidade a estímulos térmicos nocivos e a elevação da temperatura corporal dos pacientes (Eid 2011; Gavva et al., 2008). Sendo assim, ainda é necessário a realização de pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas antagonistas que possam ser utilizadas na clínica.

Outra estratégia para obter benefícios terapêuticos em certas condições patológicas seria a ativação persistente desses canais (o que promove dessensibilização), obtida através da administração repetida de seus agonistas. A capsaicina, por exemplo, apesar de inicialmente excitar seletivamente neurônios sensoriais aferentes primários provocando dor inflamatória, quando aplicada repetidamente promove a dessensibilização persistente de nociceptores polimodais, incapacitando funcionalmente os terminais sensoriais periféricos (Jancsó et al., 1977). Por esse motivo, indivíduos que fazem uso de cremes ou loções de capsaicina para o tratamento da dor de neuralgia pós-herpética, neuropatia diabética, osteoartrite e artrite reumatóides (Sasamura e Kuraishi, 1999) ficam relativamente resistentes à ela e a outros estímulos dolorosos (Jancsó e Jancsó-Gabor, 1949).

2.2.2 TRPA1

O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) é o único membro de sua subfamília TRPA. A sua estrutura difere dos demais TRPs por apresentar uma longa cauda N-terminal contendo diversos domínios anquirina (cerca de 16) (Figura 5). Este receptor foi identificado em neurônios sensoriais primários que expressam o receptor TRPV1 e neuropeptídeos como o CGRP e substância P (Story et al., 2003; Nilius et al., 2007). Além de estarem presentes em células não neuronais, como queratinócitos e células enterocromafins (Atoyan et al., 2009; Nozawa et al., 2009).

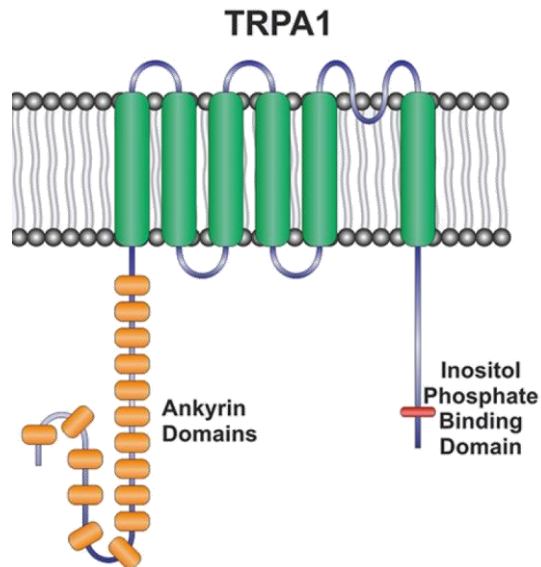


Figura 5. Estrutura do Receptor TRPA1. FONTE: Jardim et al., 2003.

Este receptor é ativado por temperatura em torno de 17 °C, que, em humanos, produz sensação de frio nocivo (Story et al., 2003). Além disso, o TRPA1 pode ser ativado por inúmeros compostos irritantes tais como, o alil isotiocianato (composto pungente do óleo de mostarda) (Jordt et al., 2004), o metil salicilato (presente no óleo de gaultéria), o cinamaldeído (princípio ativo da canela), a alicina (encontrada no alho e na cebola), o gingerol (gingibre), o eugenol (cravo), a acroleína (um irritante presente no gás lacrimogênio e na fumaça que sai dos veículos, dos cigarros e de queimadas) e o crotonaldeído (presente na fumaça dos cigarros) (Bandell et al., 2004 ; Bautista et al., 2005; Calixto et al., 2005; Bautista et al., 2006; André et al., 2008;). Existem também agonistas endógenos deste receptor, são exemplos o 4-HNE (produto da peroxidação de lípideos), prostaglandinas ciclopentanônicas, hipoclorito (produto da via da mieloperoxidase), metilglioxal (para revisão ver Julius et al., 2013).

Similarmente ao receptor TRPV1, o TRPA1 é regulado negativamente pelo PIP₂. A enzima AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) também promove esse efeito de diminuição da ativação destes receptores (Wang et al., 2017). Por outro lado, moléculas como a PKC, a PKA, a PLC e a quinase dependente de ciclina 5 (cdk5) modulam positivamente a atividade do TRPA1, sendo que as três primeiras moléculas interferem na ligação do PIP₂ (como descrito anteriormente) ao receptor, e a última, cdk5,

fosforila este canal iônico mantendo-o em sua conformação aberta (Dai et al. 2007; Hall et al. 2018).

Já foi demonstrado em diversas pesquisas a ocorrência da ativação do receptor TRPA1 em múltiplos quadros patológicos. São exemplos, a dermatite de contato, na qual este receptor participa da resposta inflamatória, promovendo a formação de edema e prurido; a hiperalgesia e alodinia mecânica em quadros de neuropatia diabética ou induzida por quimioterapia; e em disfunções gastrointestinais, como a colite (Para revisão ver Moran, 2017).

Antagonistas do TRPA1, como HC-030031 e A-967079, mostraram-se eficientes no tratamento destas afecções em estudos pré-clínicos. Empresas já estão realizando ensaios clínicos de fase I com alguns antagonistas, como o GRC-17536. Estes compostos estão se mostrando eficazes e mais seguros em relação aos antagonistas TRPV1, visto que não promovem a elevação da temperatura corporal (Chen & Hackos, 2015).

De modo similar ao TRPV1, agonistas TRPA1 também podem causar a dessensibilização do receptor, como por exemplo, o óleo de mostarda, quando administrado repetidamente, é capaz reduzir de a sensação de dor em pacientes com dermatite atópica (Heyer et al., 1991; Akopian et al., 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da variedade Swiss machos (25-30 g). Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade Federal do Paraná em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à água e ração (Nuvilab CR-1, Quimtia SA, Brasil). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o número 1125. Todos os experimentos foram conduzidos respeitando as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para a investigação da dor experimental em animais conscientes (Zimmerman, 1993).

3.2 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL

Inicialmente, foi avaliado se o trans-anetol causava efeitos nociceptivos quando administrados via intraplantar em camundongos. Para tanto, após um período de adaptação de 1 hora no aparato experimental, o qual consistiu de um funil de vidro invertido transparente, os animais receberam via intraplantar (injeção subcutânea na superfície dorsal de sua pata traseira direita) a injeção de 20 µl de diferentes doses de trans-anetol (100, 250, 500 nmol/20 µl/pata) ou seu veículo (5% DMSO, 5% tween80 em salina/20 µl/pata), de modo a se obter uma curva dose-resposta da nocicepção intraplantar. Para a administração do anetol, os animais foram colocados em um cone de papelão com o objetivo de imobilizá-los. Imediatamente após a administração, os animais foram recolocados sob os funis e a quantidade de tempo gasto lambendo e/ou mordendo as suas patas foi contabilizada com um cronômetro por um período de 20 minutos e considerada uma medida de nocicepção (Andrade et al., 2008).

3.3 ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL

Com a intenção de avaliar o possível envolvimento de receptores TRPA1 na nocicepção induzida pelo anetol, o antagonista do receptor TRPA1, HC-030031 (100 µg/20 µl/pata), foi co-injetado via intraplantar com o anetol (500 nmol/20 µl/pata). Em seguida, o tempo gasto pelos animais lambendo e/ou mordendo a pata injetada foi cronometrado durante 5 minutos após a coadministração. O mesmo procedimento foi realizado com a capsazepina (10 nmol e 30 nmol/20 µl/pata), antagonista do receptor TRPV1, a fim de avaliar o papel deste receptor na resposta nociceptiva promovida pelo anetol.

3.4 RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL

Muitos compostos naturais, ao entrarem em contato com a pele, podem desencadear uma resposta edematogênica pela ativação dos receptores TRPA1 e TRPV1. Nesse sentido, investigamos se a aplicação tópica de trans-anetol seria capaz de induzir a formação de edema na orelha de camundongos. Assim sendo, avaliamos o edema induzido pela instilação tópica de anetol (200 mM, 500 mM e 1000 mM/20 µl/orelha) ou de seu veículo na orelha direita dos animais. Para isso, 30, 60, 90 e 120 minutos após a aplicação dos respectivos compostos, o aumento da espessura da orelha dos animais foi aferido com auxílio de um micrômetro digital.

3.5 ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO TRANS ANETOL

Para saber se a resposta edematogênica observada era mediada por estes receptores, grupos de animais foram pré-tratados topicamente na área interna da orelha direita com HC030031 (300 nmol/20 µl/orelha) (antagonista do receptor TRPA1) ou com seu respectivo veículo (acetona). Passados 15 minutos, os diferentes grupos de animais receberam a aplicação tópica de anetol (500 mM/20 µl/orelha) na parte externa desta mesma orelha, e após 60 minutos o edema foi aferido. Após a leitura da espessura do edema, estes animais foram eutanasiados com uma overdose de Tiopental (100 mg/kg) via

intraperitoneal, e com o auxílio de um “punch” foram retiradas amostras das orelhas tratadas para análise histológica.

3.6 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA REPETIDA DE TRANS-ANETOL

Com propósito de avaliar se a aplicação tópica repetida de anetol induz o processo de sensibilização/dessensibilização das fibras sensoriais que apresentam receptores TRPV1 e TRPA1, visto que muitos agonistas TRPs promovem este efeito, grupos de animais foram tratados topicamente com o anetol (500 mM/20 µl/orelha), no 1º e 3º dia de experimento. O edema de orelha foi medido 60 minutos após cada aplicação. Os mesmos procedimentos foram realizados com a capsaicina (200 µg/ 20 µl/orelha) e com alil isotiocianato (1 M/20 µl/orelha), que são agonistas conhecidos destes receptores. No final do experimento, estes animais foram eutanasiados para coleta da orelha.

3.7 DESSENSIBILIZAÇÃO CRUZADA

Em outra série de experimentos, foi analisado se o anetol era capaz de causar inibição do edema de orelha induzido pela capsaicina ou alil isotiocianato. Nesse protocolo, animais foram pré-tratados com anetol (500 mM/20 µl/orelha) no 1º dia de experimento. No 3º dia, capsaicina (200 µg/ 20 µl/orelha) ou alil isotiocianato (1 M/20 µl/orelha) foram instilados topicamente na mesma orelha. Sessenta minutos após a aplicação dos agonistas, o edema foi medido como descrito acima.

Por fim, foi investigado se o pré-tratamento com alil isotiocianato (1 M/20 µl/orelha) ou capsaicina (200 µg/20 µl/orelha) no 1º dia, reduziria o edema induzido pelo anetol (500 mM/20 µl/orelha) no 3º dia. Para isso, foi aplicado protocolo similar ao anterior.

Ao final de cada experimento os animais foram eutanasiados com uma overdose de Tiopental (100 mg/kg) por via intraperitoneal e tiveram uma amostra da orelha direta coletada para análise histológica.

3.8 HISTOLOGIA

Os tecidos de orelha coletados foram fixados em formalina e emblocados em parafina. A coloração foi feita com hematoxilina e eosina. A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX51), no aumento de 20x. Com auxílio do programa Fiji versão 2.0 (Image J, Maryland, EUA), a espessura (distância entre as duas camadas da epiderme) de cada corte foi medida.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como a média \pm erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas através do test t de Student ou por ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Dunnet ou de Bonferroni quando necessário. As análises foram realizadas usando o programa para Windows, GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL

Os dados obtidos demonstram que o anetol nas doses de 250 nmol e 500 nmol promoveu resposta nociceptiva ($22,5 \pm 5,3$ s e $47,8 \pm 11,9$ s, respectivamente) imediatamente após a administração do composto quando comparado com seu veículo ($0,29 \pm 0,29$ s) (Gráfico 1). Esse efeito foi observado até 5 minutos após a administração do anetol.

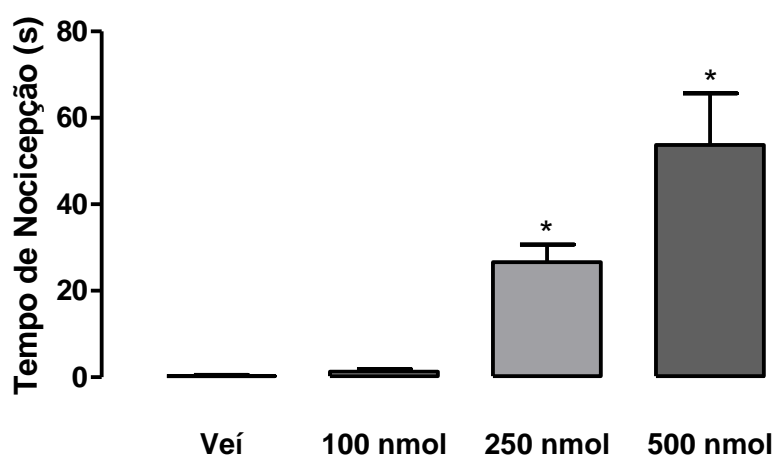


Gráfico 1. Curva dose resposta para o anetol (100, 250 e 500 nmol/20 μ l/pata) injetado na pata de camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 08). A comparação foi realizada através do teste ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Dunnet. Diferente do grupo veículo para * P < 0,05.

4.2 ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL

A administração do antagonista do receptor TRPA1, HC030031, foi capaz de abolir a nocicepção induzida pelo anetol, em aproximadamente 96%, como observado no Gráfico 2.

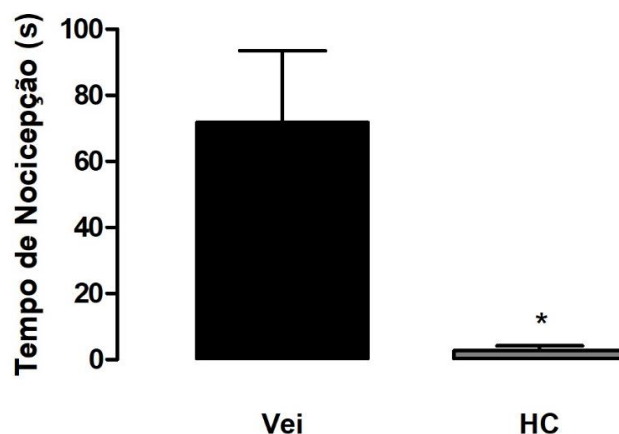


Gráfico 2: Efeito do HC030031 (100 µg/20 µl/pata) sobre a nociceção induzida pelo anetol 500 nmol/20 µl/pata em camundongos. A resposta nociceptiva teve inibição de 96% no grupo tratado com o antagonista. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 10). A comparação foi realizada através do teste t de Student. Diferente do grupo veiculo para * P < 0,05.

Já, a capsazepina (antagonista do TRPV1) não promoveu este mesmo efeito. Em ambas as doses testadas, não foi possível observar a redução da resposta nociceptiva causada pelo anetol (Gráfico 3).

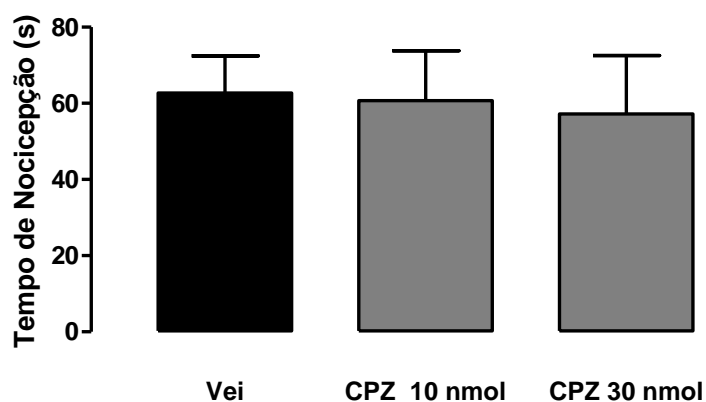


Gráfico 3: Efeito da Capsazepina (10 e 30 nmol/20 µl/pata) sobre a nociceção induzida pelo anetol 500 nmol/20 µl/pata em camundongos. Não houve inibição significativa da resposta nociceptiva. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 10). A comparação foi realizada através do teste ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Dunnet.

4.3 RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL

A aplicação tópica de anetol na orelha dos camundongos foi capaz de induzir a formação de edema em todas as concentrações administradas, como

pode ser observado na Gráfico 4. O veículo usado para diluir o composto não foi capaz de causar edema.

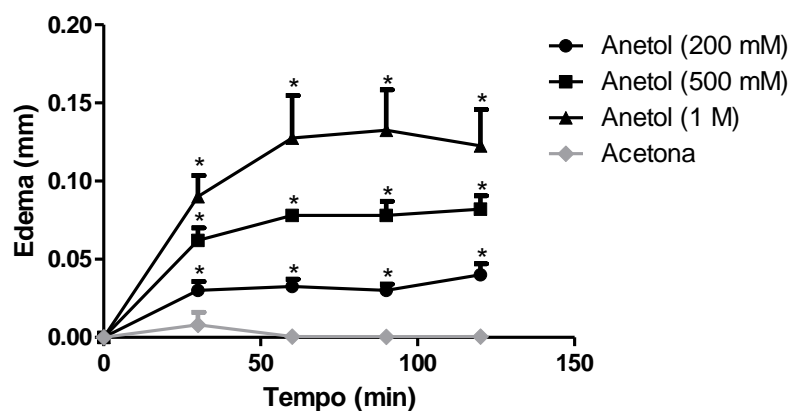


Gráfico 4. Curva dose resposta para o anetol (200, 500 e 1000 mM/20 µl/orelha) instilado na orelha de camundongos. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 08). A comparação foi realizada através do teste t de Student. Diferente do grupo veículo para * P < 0,05.

4.4 ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPA1 NA RESPOSTA EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO TRANS-ANETOL

Os animais que foram pré tratados com HC030031, antagonista do receptor TRPA1, apresentaram redução significativa (aproximadamente, $44,6 \pm 9,9\%$) da resposta edematogênica promovida pelo trans-anetol, como mostrado no Gráfico 5.

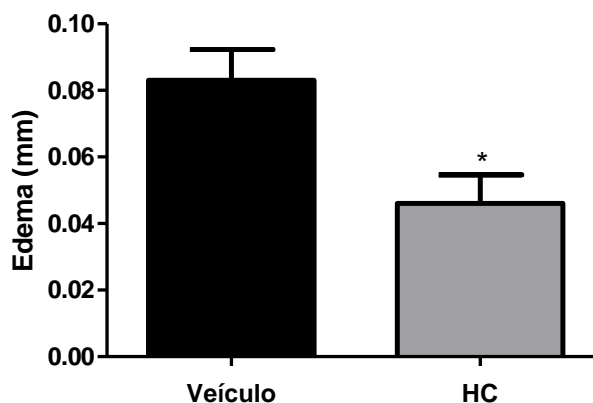


Gráfico 5. Efeito do HC030031 (300 nmol/20 µl/orelha) sobre a resposta edematogênica induzida pela aplicação tópica de anetol (500 mM/20 µl/orelha) em camundongos. O edema foi reduzido em $44,6 \pm 9,9\%$ no grupo tratado com o antagonista. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 08). A comparação foi realizada através do teste t de Student. Diferente do grupo veículo para * P < 0,05.

Os dados obtidos na análise histológica da orelha de ambos os grupos de animais corroboraram com o resultado acima. Assim, a espessura das orelhas que foram tratadas com HC030031, foi significativamente menor ($22,4\pm 2,3\%$) em relação ao grupo não tratado (Figura 6 e Gráfico 10).

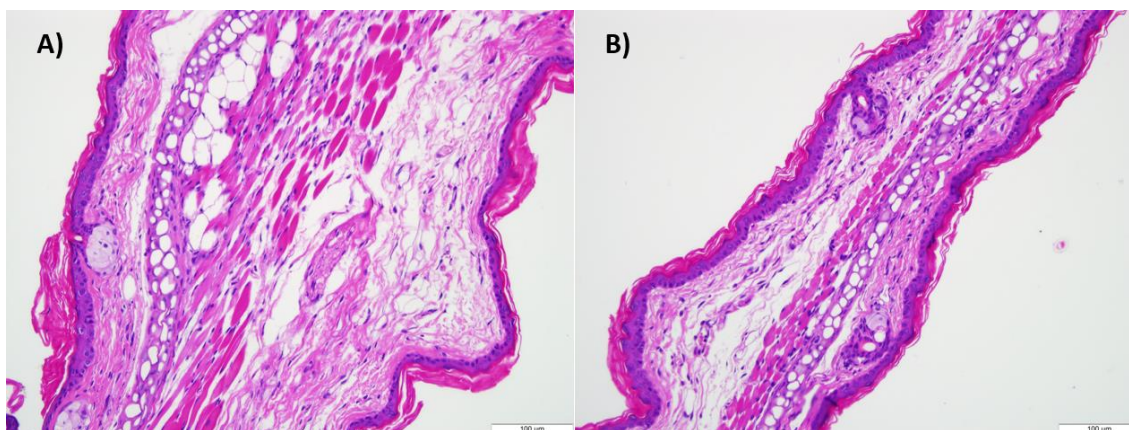


Figura 6. Corte de orelha de camundongo com edema induzido pelo trans-anetol. A) Orelha pré-tratada com acetona (grupo veículo); B) Orelha pré-tratada com HC030030.

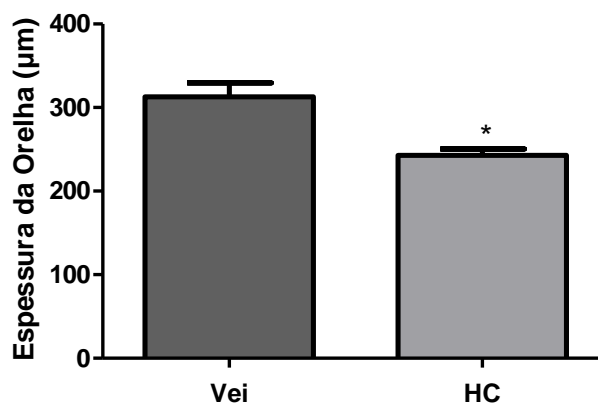


Gráfico 10. Análise histológica do efeito do HC030031 (300 nmol/20 µl/orelha) sobre a resposta edematogênica induzida pela aplicação tópica de anetol (500 mM/20 µl/orelha) em camundongos. O edema foi reduzido em $22,4\pm 2,3\%$ no grupo tratado com o antagonista. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 08$). A comparação foi realizada através do teste t de Student. Diferente do grupo veículo para * $P < 0,05$.

4.5 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA REPETIDA DE TRANS-ANETOL

Os dados demonstram que em orelhas pré-tratadas com capsaicina no primeiro dia, a resposta edematogênica no terceiro dia foi reduzida em aproximadamente $60\pm 9,7\%$ (Gráfico 6.A). O mesmo efeito foi observado para o alil isotiocianato, que apresentou uma redução de $36,9\pm 11,9\%$ no edema formado (Gráfico 6.B).

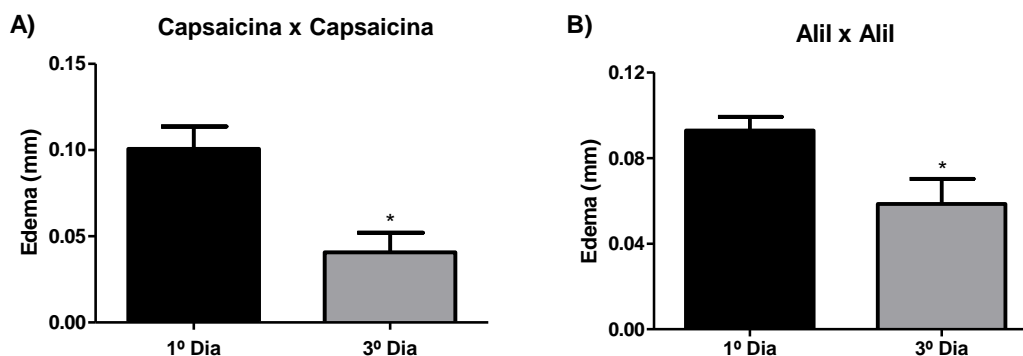


Gráfico 6. Efeito de repetidas aplicações tópicas de agonistas TRPs na orelha de camundongos. A) Tratamento com capsaicina (200 µg/20 µl/orelha) no 1º dia, reduz resposta edematogênica em aproximadamente 60±9,7% no 3º dia; B) Tratamento com alil (1 M/20 µl/orelha) no 1º dia, inibe em 36,9±11,% o edema formado por este composto no 3º dia. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 08). A comparação foi realizada através do teste t de Student. * P < 0,05 difere significativamente do edema formado no 1º dia de aplicação de capsaicina ou alil isotiocianato.

Os animais que foram tratados topicamente no primeiro e terceiro dia de experimento com anetol também apresentaram diminuição significativa (69,2±7,7%) do edema induzido por este composto, como é possível notar no Gráfico 7.

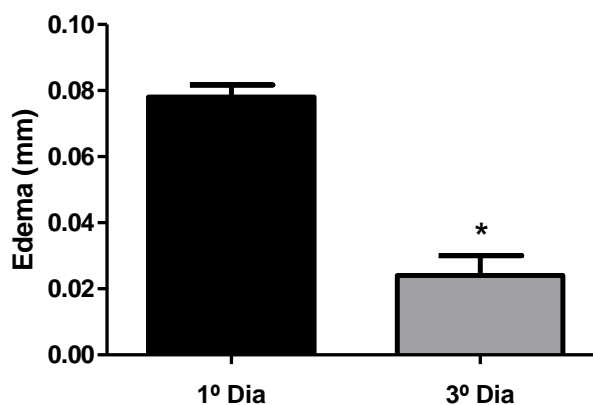


Gráfico 7. Efeito de repetidas aplicações tópicas de trans-anetol (500 mM/20 µl/orelha) na orelha de camundongos. A resposta edematogênica teve inibição de aproximadamente 69,2±7,7%. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 08). A comparação foi realizada através do teste t de Student. * P < 0,05 difere significativamente do edema formado no 1º dia de aplicação do anetol.

Analisando as lâminas referentes a este experimento, foi verificado primeiramente que há uma diferença significativa entre o edema formado pelo

anetol no primeiro dia de tratamento (Figura 7.B) e o seu veículo (Figura 7.A), acetona ($37,8 \pm 1,4\%$). Em seguida, pode-se notar que a espessura basal da orelha no terceiro dia (Figura 7.C), verificada antes da 2ª aplicação do anetol, difere em relação a espessura observada após o tratamento com o composto no primeiro dia ($30,9 \pm 2,5\%$), mas não ao grupo veículo. Por fim, houve uma redução do edema formado pelo anetol no terceiro dia (Figura 7.D) quando comparado com o edema formado no dia 1 ($41,8 \pm 2\%$), sendo que esse grupo não difere do grupo basal e do veículo. Todos estes dados estão representados no Gráfico 11.

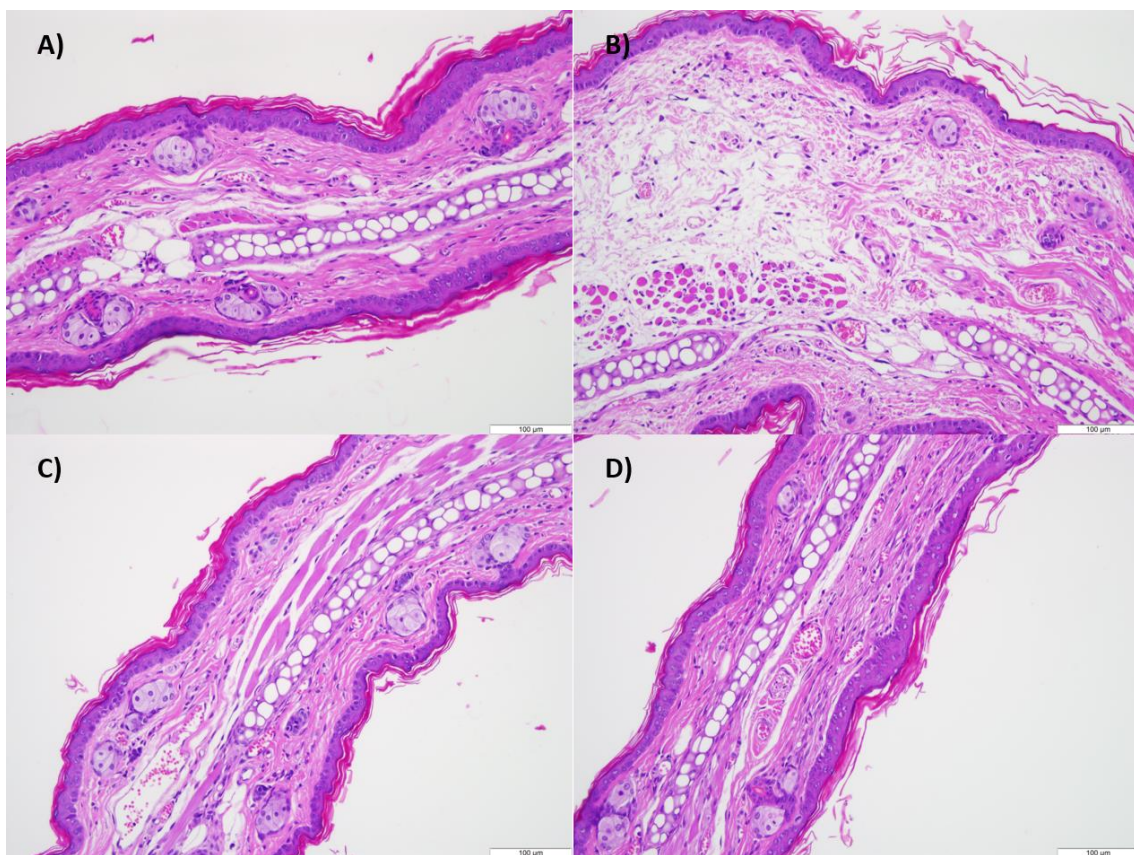


Figura 7. Corte de orelha de camundongo. A) Orelha tratada após aplicação de acetona (grupo veículo); B) Orelha após 1ª aplicação de anetol, no dia 1; C) Orelha antes da 2ª aplicação de anetol, no dia 3; D) Orelha após 2ª aplicação de anetol, no dia 3.

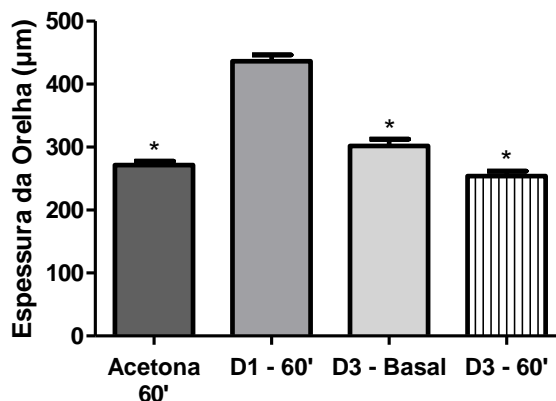


Gráfico 11. Análise histológica do efeito de repetidas aplicações tópicas de trans-anetol (500 mM/20 µl/orelha) na orelha de camundongos. A resposta edematogênica induzida pelo composto no 3º dia foi reduzida em aproximadamente 41,8±2%. O edema provocado pelo anetol no 1º dia difere significativamente do seu veículo (acetona) em 37,8±1,4%, e do valor basal medido no 3º dia (30,9±2,5%). Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 08). A comparação foi realizada através do teste ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni. * P < 0,05 difere significativamente do edema formado no 1º dia de aplicação do anetol.

4.6 DESSENSIBILIZAÇÃO CRUZADA

Ao realizar a dessensibilização cruzada do anetol com a capsaicina, foi verificado que os camundongos que foram pré-tratados com o anetol no primeiro dia, tiveram uma redução (50±3,3%) na resposta edematogênica promovida pela capsaicina, quando esta foi administrada no terceiro dia. Da mesma forma, as orelhas pré-tratadas com a capsaicina no dia um, apresentaram inibição significativa (94,9±3,4%) do edema induzido pelo anetol, no dia 3 (Gráfico 8).

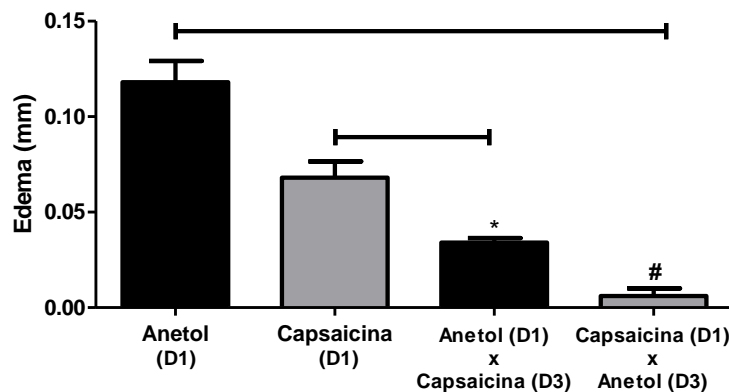


Gráfico 8. As orelhas pré tratadas com anetol ou capsaicina, tiveram a resposta edematogênica induzida pela capsaicina ou anetol no 3º dia, significativamente inibidas ($50 \pm 3,3\%$ e $94,9 \pm 3,4\%$, respectivamente). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 08$). A comparação foi realizada através do teste ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni. * $P < 0,05$ difere significativamente do edema formado no 1º dia de aplicação de capsaicina. # $P < 0,05$ difere significativamente do edema formado no 1º dia de aplicação de anetol.

O pré tratamento de animais com anetol, também diminuiu a resposta edematogênica provocada pelo alil isotiocianato no terceiro dia, em aproximadamente $37,5 \pm 7,8\%$. E por fim, a aplicação de alil isotiocianato no primeiro dia de experimento, inibiu em torno de $51,2 \pm 7,4\%$ o edema causado pelo trans-anetol. Estes resultados podem ser observados no Gráfico 9.

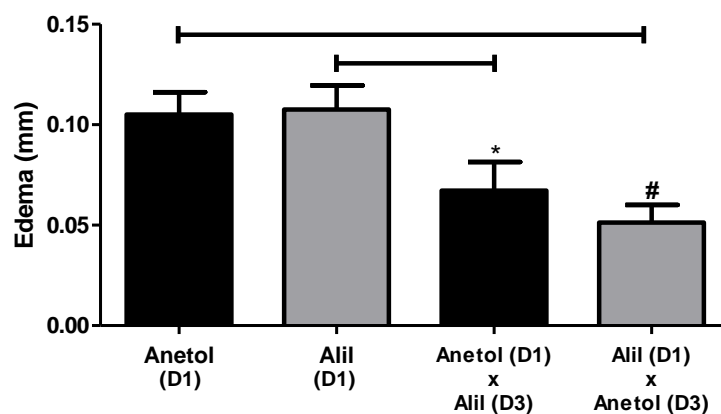


Gráfico 9. As orelhas pré tratadas com anetol ou alil, tiveram a resposta edematogênica induzida pelo alil ou anetol no 3º dia, significativamente inibidas ($37,5 \pm 7,8\%$ e $51,2 \pm 7,4\%$, respectivamente). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 08$). A comparação foi realizada através do teste ANOVA de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni e teste t para o anetol vs alil. * $P < 0,05$ difere significativamente do edema formado no 1º dia de aplicação de capsaicina. # $P < 0,05$ difere significativamente do edema formado no 1º dia de aplicação de anetol.

5. DISCUSSÃO

A utilização popular de plantas medicinais e seus óleos essenciais no tratamento de diversas doenças não é algo recente. Ao longo dos anos a literatura tem demonstrado que muitos dos efeitos terapêuticos relatados pela população após o uso de plantas medicinais se deve ao composto majoritário presente na planta ou a soma de alguns constituintes presentes nela. Contudo, ainda existe uma grande lacuna no que se refere ao mecanismo pelo qual essas plantas ou seus constituintes majoritários atuam. Como exemplo disso, podemos citar o anetol que apesar de ser o composto majoritário de plantas como o anis estrelado, a erva doce e a canela de cunhã, e essas plantas serem usadas popularmente no tratamento de problemas gastrointestinais, como agente expectorante e diurético, ainda não se sabe o mecanismo pelo qual esse composto ou essas plantas atuam pra promover tais efeitos. Ainda em relação ao anetol, percebe-se que as informações presentes na literatura são escassas e os poucos estudos demonstram que algumas ações promovidas por esse composto, como o efeito antiedematogênico, parece ser decorrente da inibição de óxido nítrico (NO) e substância P, visto que estes compostos aumentam a permeabilidade vascular e são vasodilatadores. Outros autores relatam que o tratamento com anetol também inibe o edema provocado pela histamina, bradicinina e serotonina. Já a atividade antinociceptiva, foi reportada como sendo por inibição de prostaglandinas e citocinas, como IL-1 β , TNF- α e IL-17, que são mediadores inflamatórios envolvidos na sensibilização das fibras nociceptoras (Domiciano et al., 2012; Ponte et al., 2012; Ritter et al., 2012). Todos esses efeitos observados foram decorrentes da administração sistêmica do anetol.

Nesse sentido, em nosso estudo, procuramos avaliar não somente se esse composto teria uma ação tópica mas também seu possível mecanismo de ação.

Nossos resultados demonstraram que a aplicação tópica do anetol foi capaz de promover nocicepção quando administrado via intraplantar, sendo esta resposta dose-dependente. A resposta nociceptiva iniciou-se logo após a injeção do composto, permanecendo de forma intensa nos primeiros cinco

minutos, sendo este comportamento característico da dor neurogênica, que é desencadeada pela liberação de substância P, CGRP e neurocinina A com consequente ativação direta das fibras C. Além disso, a liberação desses neuropeptídeos pelas terminações periféricas promove vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, o que acarreta no aumento do fluxo sanguíneo e extravasamento do líquido plasmático no local de injúria, contribuindo dessa forma para resposta edematogênica (Foreman, 1987; Holzer, 1998).

Nesse estudo, nós também observamos que a aplicação tópica de trans-anetol na orelha de camundongos induziu a formação de edema de maneira dose-dependente. Essa resposta edematogênica teve o pico em uma hora, se mantendo até duas horas depois da aplicação do composto. Após este período, foi observado a diminuição do edema formado.

Dados da literatura têm demonstrado que compostos isolados de plantas que ativam receptores TRPs, como capsaicina (agonista de TRPV1), cinamaldeído e alilisotiocianato (agonistas de TRPA1), também causam nocicepção e edema com perfil muito semelhante ao encontrado nesse estudo com o anetol (Andrade et al., 2008; Silva et al., 2011).

Interessantemente, tanto a resposta nociceptiva quanto a edematogênica foram inibidas pelo tratamento com o antagonista do receptor TRPA1, HC030031, indicando a sua participação nestes processos. O efeito inibitório observado com o HC030031 no edema de orelha causado pelo anetol também foi confirmado pela análise histológica. Como dito anteriormente, o receptor TRPA1 está expresso em fibras sensoriais primárias que apresentam substância P e CGRP. Desta forma, é possível sugerir que a ativação do TRPA1 pelo anetol poderia estar relacionado com a liberação destes neuropeptídeos, o que resultaria em nocicepção e edema de origem neurogênica. Dando suporte a essa hipótese, um estudo realizado em 1996, por Takeyama et al., mostrou que o tratamento oral agudo com anetol tritona eleva a concentração de substância P e de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na saliva de seres humanos. Por outro lado, a resposta nociceptiva induzida pelo anetol não foi inibida pela capsazepina, sugerindo que receptores do tipo TRPV1 não estariam envolvidos nesse efeito.

Um efeito de grande importância e com relevância clínica é o processo de dessensibilização de fibras sensoriais primárias que expressam TRPs. Já foi demonstrado que repetidas aplicações de capsaicina ou cinamaldeído causam dessensibilização dessas fibras, o que resulta em analgesia perante diversos estímulos nocivos. Esse evento ocorre porque a administração contínua de um agonista TRP promove aumento da concentração de Ca^{2+} no interior dos neurônios. A entrada deste íon na célula neuronal provoca a liberação intensa dos neuropeptídeos, como substância P e CGRP, depletando as reservas destas moléculas. Essa dessensibilização tem justificado o uso de agonistas desses receptores, como a capsaicina em processos patológicos como dor neuropática e hiperreflexia de bexiga (Neubert et al., 2003; Szallasi & Blumberg, 1990; Tominaga & Tominaga, 2005). De fato, a capsaicina creme (0,075%) é atualmente usado, de forma tópica, para o alívio de neuralgia que acompanha o herpes zoster, neuropatia diabética, dor na osteoartrite ou artrite reumatóide.

Como esperado, o alil isotiocianato e a capsaicina, foram capazes de causar inibição do edema após repetidas aplicações. Interessantemente, o efeito edematogênico causado pelo anetol também foi reduzido após repetidas aplicações tópicas, sugerindo um possível mecanismo de dessensibilização semelhante ao observado pela capsaicina e pelo alil isotiocianato. Esse efeito também foi confirmado pela análise histológica.

Nesse estudo, também foi possível observar uma dessensibilização cruzada entre o anetol, capsaicina ou alil. Essa dessensibilização foi confirmada com a redução do edema promovido pelo alil ou capsaicina em animais pré tratados com anetol, sendo que o pré tratamento com estes compostos também inibiram a resposta edematogênica do anetol. Desta forma, com base nos dados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que tanto a resposta nociceptiva quanto edematogênica podem estar ocorrendo pela ativação do receptor TRPA1, e que o efeito antiedematogênico observado se deve a dessensibilização das fibras sensoriais que apresentam receptores TRPs.

É importante salientar também que alguns autores como Ritter et al. (2012), Ponte et al. (2012) e Domiciano et al. (2012) relataram em seus

estudos que o anetol apresenta atividade antinociceptiva, antiedematogênica e anti-inflamatória, respectivamente. No entanto, em todos os experimentos realizados por esses pesquisadores, o anetol foi administrado por via oral uma hora antes da aplicação dos compostos irritantes (como óleo de cróton, carragenina e PGE₂). Possivelmente, o tratamento com anetol pode ter dessensibilizado as fibras sensoriais aferentes, tornando o animal temporariamente resistente aos efeitos nocivos destes agentes. Dados da literatura demonstram que alguns compostos administrados por via oral podem causar dessensibilização de TRPs. De fato, Materazzi e colaboradores (2013) demonstraram que o partenólídeo, um dos principais constituintes do tanaceto, também conhecido como feverfew (*Tanacetum parthenium L*), ativa o TRPA1 in vivo e in vitro e a sua administração oral aguda ou subcrônica também reduz a resposta nociceptiva provocada pelos agonistas do TRPA1, sugerindo uma dessensibilização deste canal. Então, nossos resultados em conjunto com os dados da literatura sugerem que o anetol pode promover suas ações, em parte, via ativação do receptor TRPA1, o que explicaria o efeito nociceptivo e edematogênico observado nesse estudo. Finalmente, os dados desse trabalho também mostram um possível efeito de dessensibilização das fibras TRPs após repetidas aplicações com anetol, sugerindo assim uma possível aplicação clínica desse composto, na forma tópica, para o tratamento de algumas patologias de pele ou no tratamento da dor no qual haja envolvimento desses receptores.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que:

- O trans-anetol é capaz de promover efeitos nociceptivos e edematogênicos.

- O tratamento com o HC030031, antagonista do receptor TRPA1, foi capaz de inibir a resposta nociceptiva e edematogênica.

- O tratamento com o antagonista do receptor TRPV1, capsazepina, não foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva causada pelo trans-anetol.

- Foi demonstrado neste estudo que a aplicação tópica contínua de trans-anetol promoveu uma redução da resposta edematogênica induzida pelo próprio composto e por outros agonistas TRPs, como o alil isotiocianato e a capsaicina. Esse efeito se deve, possivelmente, a dessensibilização das fibras sensoriais que apresentam TRPs.

Desta forma, é possível sugerir que os efeitos nociceptivos e edematogênicos sejam causados pela ativação dos receptores TRPA1 e que o efeito antiedematogênico seja mediado pela dessensibilização destes receptores. No entanto, novos estudos estão sendo realizados para melhor esclarecer a participação do TRPA1 e de outros receptores TRPs no efeito do anetol.

REFERÊNCIAS

AKOPIAN, A.; RUPAREL, N.; JESKE, N.; HARGREAVES, K.; Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. **J. Physiol.**, 583: 175-193, 2007.

AL HARBI M. M.; QURESHI, S.; RAZA, M.; AHMED, M. M.; GIANGRECO, A. B.; SHAH, A. H. Influence of anethole treatment on the tumor induced by Ehrlich ascites carcinoma cells in paw of Swiss albino mice. **European Journal of Cancer Prevention**, 4:307-318. 1995.

ANDRADE, E.; FERREIRA, J.; ANDRÉ, E.; CALIXTO, J. Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. **Biochemical Pharmacology**, 72(1):104-114, 2006.

ANDRADE, E.; LUIZ, A.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**, 152(2):511–520, 2008.

ANDRÉ, E.; CAMPI, B.; MATERAZZI, S.; TREVISANI, M.; AMADESI, S.; MASSI, D.; CREMINON, C.; VAKSMAN, N.; NASSINI, R.; CIVELLI, M.; BARALDI, P.; POOLE, D.; BUNNETT, N.; GEPPETTI, P.; PATACCHINI, R. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by α , β -unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. **The Journal of Clinical Investigation**, 118(7): 2574-82, 2008.

ATOYAN, R.; SHANDER, D.; BOTCHKAREVA, N. V. Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, 129:2312–2315, 2009.

BANDELL, M.; STORY, G. M.; HWANG, S. W.; VISWANATH, V.; EID, S. R.; PETRUS, M. J.; EARLEY, T. J; et al., Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, 41:849-857, 2004.

BAUTISTA, D.; MOVAHED, P.; HINMAN, A.; AXELSSON, H.; STERNER, O.; HÖGESTÄTT, E.; JULIUS, D.; JORDT, S.; ZYGMUNT, P. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 102(34):12248-12252, 2005.

BAUTISTA, D.; JORDT, S.; NIKAI, T.; TSURUDA, P.; READ, A.; POBLETE, J.; YAMOAH, E.; BASBAUM, A.; JULIUS, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, 124(6):1269-1282, 2006.

BIRDER, L. A.; NAKAMURA, Y.; KISS, S.; NEALEN, M. L.; BARRICK, S.; KANAI, A. J.; WANG, E.; RUIZ, G.; GROAT, W. C.; APODACA, G.; WATKINS, S.; CATERINA, M. J. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. **Neuroscience**, (9):856-860, 2002.

BIRDER, L. A. TRPs in bladder diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1772:879-884, 2007.

CALIXTO, J.; KASSUYA, C.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology Therapy**, 106:179-208, 2005.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389(6653):816-24, 1997.

CHAN, C.L.; FACER, P.; DAVIS, J.B.; SMITH, G.D.; EGERTON, J.; BOUNTRA, C.; WILLIAMS, N.S.; ANAND, P. Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. **Lancet**, 361:385–391, 2003.

CHAINY B. N.; MANNA, S. K.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- κ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, 19:2943-2950, 2000.

CHEN, J.; HACKOS, D. H. TRPA1 as a drug targets: promise and challenges. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 388(4): 451–463, 2015.

DAI, Y.; WANG, S.; TOMINAGA, M.; YAMAMOTO, S.; FUKUOKA, T.; HIGASHI, T.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; NOGUCHI, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **Neuroscience**, 117(7):1979-1987, 2007.

DOMICIANO, T. P.; DALALIO, M. M. O.; SILVA, E. L.; RITTER, A. M. V.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; RAMOS, F. S.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, 386:331–338, 2012.

EID, S. Therapeutic targeting of TRP channels--the TR(i)P to pain relief. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 11(17):2118-2130, 2011.

FERREIRA, J.; SILVA, G.; CALIXTO, J. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology**, 141(5):787–794, 2004.

FREIRE R. S.; MORAIS S. M.; CATUNDA-JÚNIOR F. E.; PINHEIRO D. C. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13(13):4353-8, 2005.

FOREMAN, J. C. Peptides and neurogenic inflammation. **British Medical Bulletin**, 43(2):396-400, 1987.

GAVVA, N. R.; TREANOR, J. J. S.; GARAMI, A.; FANG, L.; SURAPANENI, S.; AKRAMI, A.; ALVAREZ, F.; BAK, A.; DARLING, M.; GORE, A.; JANG, G. R.; KESSLAK, L. N.; NORMAN, M. H.; PALLUCONI, G.; ROSE, M. J.; SALFI, M.; TAN, E.; ROMANOVSKY, A. A.; BANFIELD, C.; DAVAR, G. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. **Pain**, 136:202–210, 2008.

GEES, M.; COLSOUL, B.; NILIUS, B. The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2:a003962, 2010.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MAZZANT, G. Local anesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta Medica**, 67 (6):564-566, 2001.

GRAVA, A.; FERRARI, L.; PARADA, C.; DEFINO, H. Tratamento farmacológico da hiperalgesia experimentalmente induzida pelo núcleo pulposo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 45(6):569-76, 2010.

GRONEBERG, D. A.; NIIMI, A.; DINH, Q. T.; COSIO, B.; HEW, M.; FISCHER, A.; CHUNG, K. F. Increased Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 in Airway Nerves of Chronic Cough. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 170(12):1276-1280, 2004.

HALL, B. E.; PROCHAZKOVA, M.; SAPIO, M. R.; MINETOS, P.; KUROCHKINA, N.; BINUKUMAR, B. K.; AMIN, N. D.; TERSE, A.; JOSEPH, J.; RAITHEL, S. J.; MANNES, A. J.; PANT, H. C.; CHOUNG, M. K.; IADAROLA, M. J.; KULKARNI, A. B. Phosphorylation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 by Cyclin-dependent Kinase 5 affects Chemo-nociception. **Scientific Reports**, 8:1177, 2018

HAN, S. B.; KIM, H.; CHO, H.; LEE, J. D.; CHUNG, J. H.; KIM, H. S. Transient Receptor Potential Vanilloid-1 in Epidermal Keratinocytes May Contribute to Acute Pain in Herpes Zoster. **Acta Dermato-Venereologica**, 96: 319–322, 2016

HENRIQUES M.G.; SILVA P.M.; MARTINS M.A.; FLORES C.A.; CUNHA F.Q.; ASSREUY-FILHO J.; CORDEIRO R.S. Mouse paw edema: A new model for inflammation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 20:243–249, 1987.

HEYER, G.; HORNSTEIN, O. P.; HANDWERKER, H. O. Reactions to intradermally injected substance P and topically applied mustard oil in atopic dermatitis patients. **Acta Dermato-Venereologica**, 71:291–295, 1991.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **General Pharmacology: The Vascular System**, 30(1):5-11, 1998.

HSIEH, Y.; CHIANG, H.; TSENG, T.; HSIEH, S. Enhancement of cutaneous nerve regeneration by 4-methylcatechol in resiniferatoxin-induced neuropathy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 67(2): 93-104, 2008.

INOUE K.; KOIZUMI S.; FUZUIWARA S.; DENDA S.; INOUE K.; DENDA, M. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 291:124–129, 2002.

JANCSÓ, G.; KIRALY, E.; JANCSÓ-GÁBOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. **Nature**, 270:741 – 743, 1977.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A. Desensitization of sensory nerve endings (in Hungarian). **Kiserletes Orvostudomány**, 2:15, 1949.

JORDT, S.; BAUTISTA, D.; CHUANG, H.; MCKEMY, D.; ZYGMUNT, P.; HÖGESTÄTT, E; MENG, I.; JULIUS, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**, 427:260-265, 2004.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 29:355-84, 2013.

KELLY, S.; CHAPMAN, R. J.; WOODHAMS, S.; SAGAR, D. R.; TURNER, J.; BURSTON, J. J.; CHAPMAN, V. Increased function of pronociceptive TRPV1 at the

level of the joint in a rat model of osteoarthritis pain. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 74(1):252–259, 2013.

KIDO, M. A.; MUROYA, H.; YAMAZA, T.; TERADA, Y.; TANAKA, T. Vanilloid Receptor Expression in the Rat Tongue and Palate. **Journal of Dental Research**, 82(5):393-397, 2003.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; KUSTRAK. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). **Acta Pharmaceutica**, 55: 377–385, 2005.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, 989–1003, 2007.

MANDADI, S; ROUFOGALIS, D. (2008) ThermoTRP Channels in Nociceptors: Taking a Lead from Capsaicin Receptor TRPV1. **Neuropharmacology**, 6:21-38.

MATERAZZI, S.; BENEMEI, S.; FUSI, C.; GUALDANI, R.; SIENA, G.; VASTANI, N.; ANDERSSON, D. A.; TREVISAN, G.; MONCELLI, M. R.; WEI, X.; DUSSOR, G.; POLLASTRO, F.; PATACCHINI, R.; APPENDINO, G.; GEPPETTI, P.; NASSINI, R. Parthenolide inhibits nociception and neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system by targeting the TRPA1 channel. **Pain**. 154:2750–2758, 2013.

MEENTS, J. E.; NEEB, L.; REUTER, U. TRPV1 in migraine pathophysiology. **Trends in Molecular Medicine**, 16(4):153-9, 2010.

MEOTTI, F. C.; LEMOS DE ANDRADE, E.; CALIXTO, J. B. TRP modulation by natural compounds. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 223:1177-238, 2014.

MEZEY, E.; TÓTH, Z. E.; CORTRIGHT, D. N.; ARZUBI, M. K.; KRAUSE, J. E.; ELDE, R.; GUO, A.; BLUMBERG, P. M.; SZALLASI, A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97(7):3655-60, 2000.

MILANO, J.; ROSSATO, M.; OLIVEIRA, S.; DREWES, C.; MACHADO, P.; BECK, P.; ZANATTA, N.; MARTINS, M.; MELLO, C.; RUBIN, M.; FERREIRA, J.; BONACORSO, H.; Antinociceptive action of 4- methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. **Life Science**, 83:739-746, 2008.

MINKE, B. The History of the Drosophila TRP Channel: The Birth of a New Channel Superfamily. **Journal of Neurogenetics**, 24: 216–233, 2010.

MOGANA, R.; WIART, C. *Canarium* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Journal of Pharmacy Research**, 4(8): 2482-2489, 2011.

MONTELL, C.; RUBIN, G. M. Molecular Characterization of the Drosophila trp locus: A Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction. **Neuron**, (2):1313-1323, 1989.

MORAN, M. M.; MCALEXANDER, M. A.; BIRO, T.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channel as therapeutic targets. **Nature Review Drug Discovery**, 10(8):601-620, 2011.

MORAN, M. M.; SZALLASI, A. Targeting nociceptive TRP channels to treat chronic pain: current state of the field. **British Journal of Pharmacology**, 175(12):2185-2203, 2017.

NEUBERT, J. K.; KARAI, L.; JUN, J. H.; KIM, H. S.; OLAH, Z.; IADAROLA, M. J. Peripherally induced resiniferatoxina analgesia. **Pain**, 104(1):219-228, 2003.

NILIUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T.; PETERS, J. A. Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiology Review**, 87(1): 165-217, 2007.

NOZAWA, K.; KAWABATA-SHODA, E.; DOIHARA, H.; KOJIMA, R.; OKADA, H.; MOCHIZUKI, S.; SANO, Y.; INAMURA, K.; MATSUSHIME, H.; KOIZUMI, T.; YOKOYAMA, T.; ITO, H. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(9):3408-13, 2009.

OSTERWEIS, M.; KLEINMAN, A.; MECHANIC, D. Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives. **National Academies Press**, 1987.

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. **Journal of Clinical Investigation**, 115: 2393–2401, 2005.

PALAZZO, E.; LUONGO, L.; DE NOVELLIS, V.; ROSSI, F.; MARABESE, I.; MAIONE, S. Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development. **Current Opinion in Pharmacology**, 12:9-17, 2012.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature reviews**, 8(1):55-68, 2009.

PONTE, E. L.; SOUSA, P. L.; ROCHA, M. V. A.; SOARES, P. M. G.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H.; ASSREUY, A. M. S. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacological Reports**, 64:984-990, 2012.

RATHER, M. A.; DAR, B. A.; SOFI, S. N.; BHAT, B. A.; QURISH, M. A. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. **Arabian Journal of Chemistry**, 9:S1574–S1583, 2012.

RITTER, A. M. V.; DOMICIANO, T. P.; JÚNIOR, W. A. V.; ZARPELON, A. C.; SILVA, L. G.; BARBOSA, C. P.; NATALI, M. R. M.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, 21(2):187-197, 2012.

RITTER, A. M. V.; FRANCIELE, Q. A.; OTANI, F.; OLIVEIRA, R. M. W.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Effects of anethole in nociception experimental models. **Hindawi Publishing Corporation**, 2014.

SASAMURA, T.; KURAISHI, Y. Peripheral and central actions of capsaicin and VR1 receptor. **Japanese Journal of Pharmacology**, 80:275-280, 1999.

SILVA, C.; OLIVEIRA, S.; ROSSATO, M.; DALMOLIN, G.; GUERRA, G.; DA SILVEIRA PRUDENTE, A.; CABRINI, D.; OTUKI, M.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. The involvement

of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. **Life Science**, 88(25-26):1077-87, 2011.

SIQUEIRA, R. J. B.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COUTURE, R.; LAHLOU, S. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 33:238-247, 2006.

SOARES, P.M.; LIMA, R. F.; PIRES A. F.; SOUZA E.P.; ASSREUY, A.M.; CRIDDLE, D.N. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. **Life Sciences**, 8;81(13):1085-93, 2007.

STORY, G. M.; PEIER, A. M; REEVE, A. J.; EID, S. R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T. R.; EARLEY, T. J.; HERGARDEN, A. C.; ANDERSSON, D. A.; HWANG, S. W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, 112(6): 819-829, 2003.

SUNG, Y. Y.; KIM, Y. S.; KIM, H. K. *Illicium verum* extract inhibits TNF- α and IFN- γ induced expression of chemokines and cytokines in human keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, 144:182-189, 2012.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. **Life Sciences**, 47(16):1399-1408, 1990.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M; LIEDTKE W. B.; HELLER, S. Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. In: TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton, Florida: **CRC Press**, 2007.

TAKEYAMA, M.; NAGANO, T.; IKAWA, K. Anethole Trithione Raises Levels of Substance P in Human Saliva. **Pharmaceutical Sciences**, 2:581-584, 1996.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, 21(3):531-43, 1998.

TOMINAGA, M.; TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. **European Journal of Physiology**, 451(1):143-150, 2005.

VOETS, T.; TALAVERA, K.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. Sensing with TRP channels. **Nature Chemical Biology**, 1(2):85-92, 2005.

WANG, S.; KOBAYASHI, K.; KOGURE, Y.; YAMANAKA, H.; YAMAMOTO, S.; YAGI, H.; NOGUCHI, K.; DAI, Y. Negative Regulation of TRPA1 by AMP-activated Protein Kinase in Primary Sensory Neurons as a Potential Mechanism of Painful Diabetic Neuropathy. **Diabetes**, 67(1):98-109, 2018.

WES P.D.; CHEVESICH, J.; JEROMIN A.; ROSENBERG C.; STETTEN G.; MONTELL C. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92: 9652-9656, 1995.

YANG, J.F.; YANG, C.H.; CHANG, H.W.; YANG, C.S.; WANG, S.M.; HSIEH, M.C.; CHUANG, L.Y. Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Illicium verum*

Against Antibiotic-Resistant Pathogens. **Journal of Medicinal Food**, 13 (5):1254–1262, 2010.

YUN, J.; SEO, J.; JEONG, Y.; BAE, I.; JANG, W.; LEE, J.; KIM, S.; SHIN, S.; WOO, B.; LEE, K.; LIM, K.; PARK, Y. TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recover. **Journal of Dermatological Science**, 62:8-15, 2011.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16(2):109-10, 1983.