SILVIA ABIGAIL COAVOY SÁNCHEZ

**ESTUDO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS DOADORES DE
SULFETO DE HIDROGÊNIO (H₂S) SOBRE O PRURIDO AGUDO
INDUZIDO PELA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS
POR PROTEASES DO TIPO 2 (PAR-2) EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

SILVIA ABIGAIL COAVOY SÁNCHEZ

**ESTUDO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS DOADORES DE
SULFETO DE HIDROGÊNIO (H₂S) SOBRE O PRURIDO AGUDO
INDUZIDO PELA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS
POR PROTEASES DO TIPO 2 (PAR-2) EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás
Muscará

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Coavoy Sánchez, Silvia Abigail.

Estudo dos efeitos de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio (H₂S) sobre o prurido agudo induzido pela ativação dos receptores ativados por proteases do tipo 2 (PAR-2) em camundongos / Silvia Abigail Coavoy Sánchez. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Avaliação farmacológica do sulfeto de hidrogênio no prurido.

Versão do título para o inglês: Study of the effects of hydrogen sulfide (H₂S) donors on acute pruritus induced by the activation of protease-activated receptor type-2 (PAR-2) in mice.

1. Inflamação 2. Prurido 3. Receptor ativado por protease-2 4. SLIGRL-NH₂ 5. Sulfeto de hidrogênio 6. Camundongo I. Muscará, Prof. Dr. Marcelo Nicolas II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB020/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Silvia Abigail Coavoy Sánchez.

Título da Dissertação: Estudo dos efeitos de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio (H₂S) sobre o prurido agudo induzido pela ativação dos receptores ativados por proteases do tipo 2 (PAR-2) em camundongos.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	--

Decl. CEUA.008/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 100/13/CEUA, aprovado em 24.09.13, e por solicitação da Profa. Dra. **Soraia Kátia Pereira**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluna **Silvia Abigail Coavoy Sánchez** ao Projeto de Pesquisa "*Avaliação farmacológica de composto doadores de sulfeto de hidrogênio (clássicos e de liberação lenta) no prurido em pele de camundongos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 24 de janeiro de 2014.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

Dedico esta obra:

Aos meus pais Daniel Coavoy e Lidia Sánchez, pelo imenso amor, dedicação, carinho, incentivo e exemplo que sempre demonstraram em cada etapa da minha vida. Com vocês aprendi que com a ajuda de Deus eu posso alcançar todos os meus objetivos.

Às minhas irmãs Katy Araceli e Ibeth Anny por me darem amor, força e perseverança para alcançar meus sonhos.

Muito obrigada!

Amo vocês infinita e incondicionalmente

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai de amor, Criador, Sustentador, Salvador e Consolador, cuja graça e misericórdia me permitiu realizar este trabalho.

À minha família que sempre estiveram orando por mim e me incentivando na conquista dos meus ideais.

Ao professor Dr. Marcelo N. Muscará, meu especial agradecimento por sua inestimável orientação, pela oportunidade concedida, pela paciência e confiança. Seu exemplo de dedicação ao trabalho, competência e cooperação sincera proporcionaram valiosos ensinamentos, que foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À professora Dra. Soraia Costa, pelas colaborações dadas a este trabalho.

À Dra. Simone Teixeira e ao MSc. Antonio Soares, pela infinita atenção, pela transmissão do saber e pela disposição continua para me ajudar, além da amizade e companheirismo.

Aos meus amigos e colegas do laboratório que se tornaram como uma grande família. Agradeço pelas sugestões, críticas, pelo apoio, carinho e pela ajuda incondicional. Foi um prazer conviver com todos vocês. Em especial Anderson, Flávia, Flavinha, Fernando, Juliana, Karla, Leandro, Salvador e Tuanny.

Ao Carlos, pelo incentivo, paciência, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas, pela transmissão de conhecimento.

Aos meus amigos peruanos que sempre faziam de nossos encontros estímulos para continuarmos na luta.

A CAPES e a Universidade de São Paulo pelo apoio financeiro e de infraestrutura para que este trabalho fosse realizado.

Ao Brasil, por me acolher e me mostrar a sua bela cultura.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho torne-se realidade, a minha gratidão e meu respeito.

Que Deus abençoe a todos!

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

RESUMO

Coavoy-Sánchez SA. Estudo dos efeitos de compostos doadores de sulfeto de hidrogênio (H_2S) sobre o prurido agudo induzido pela ativação dos receptores ativados por proteases do tipo 2 (PAR-2) em camundongos. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

No presente trabalho foram investigados os efeitos dos doadores de sulfeto de hidrogênio (H_2S) sobre o comportamento de coçar agudo mediado pela ativação do receptor ativado por protease tipo-2 (PAR-2) em camundongos, assim como alguns dos possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos. A injeção intradérmica do peptídeo agonista PAR-2 SLIGRL-NH₂ (8-80 nmol/sítio) causou um comportamento de coçar de intensidade dependente da dose, alcançando um pico de resposta aos 10 min e retornando ao basal dentro dos 30 min. O pré-tratamento intraperitoneal com o antagonista do receptor H1 pirilamina (30 mg/kg) não inibiu o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH₂ mas inibiu significativamente aquele induzido pela histamina. As coinjeções do SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) com o doador de liberação lenta de H_2S GYY4137 (1 e 3 nmol/sítio) ou com o doador espontâneo NaHS (0.3 e 1 nmol/sítio) resultaram em respostas significativamente reduzidas. O pré-tratamento com NaHS (0.1 e 0.3 nmol/sítio), mas não com GYY4137, também resultou em redução significativa do comportamento de coçar. O cotratamento com o bloqueador dos canais K_{ATP} glibenclamida (200 nmol/sítio) aboliu o efeito antipruriginoso do H_2S . A coinjeção do doador não enzimático de óxido nítrico (NO) nitroprusiato de sódio (10 nmol/sítio) reverteu significativamente o efeito antipruriginoso do H_2S , entretanto este efeito foi independente da estimulação da guanilil ciclase solúvel, em vista de que o cotratamento com o inibidor específico desta enzima ODC (3-30 μ g/sítio) não teve efeitos significativos sobre a ação antipruriginosa do H_2S . Ensaios de Western blot mostraram que receptores PAR-2 e receptores de potencial transitório anquirina tipo 1 (TRPA1) são expressos constitutivamente na pele de camundongos. O antagonista TRPA1 HC-030031 (20 μ g/sítio) reduziu significativamente o comportamento de coçar induzido por SLIGRL-NH₂, contudo o comportamento de coçar induzido pelo agonista TRPA1 AITC (1000 nmol/sítio) não foi afetado pelo H_2S . Em conclusão, nossos dados mostram que o prurido secundário à ativação do PAR-2 pode ser reduzido por H_2S , atuando via a abertura dos canais K_{ATP} e envolvendo NO de uma forma independente de GMPc. Ademais, o receptor TRPA1 pode mediar o prurido induzido pela ativação do PAR-2, porém o H_2S não interfere com esta via. Consideramos que estes resultados fornecem suporte para o desenvolvimento de novos tratamentos para o prurido, principalmente aquele que não responde a anti-histamínicos.

Palavras-chave: Prurido. Receptor ativado por protease-2 (PAR-2). SLIGRL-NH₂. Sulfeto de hidrogênio (H_2S). Camundongo.

ABSTRACT

Coavoy-Sánchez SA. Study of the effects of hydrogen sulfide (H₂S) donors on acute pruritus induced by the activation of protease-activated receptor type-2 (PAR-2) in mice. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

In the present study, we investigated the effects of hydrogen sulfide (H₂S) donors on the acute scratching behavior mediated by the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice, as well as some of the possible pharmacological mechanisms involved. The intradermal (i.d.) injection of the PAR-2 peptide agonist SLIGRL-NH₂ (8-80 nmol/site) caused a dose-dependent scratching, with a peak response observed at 10 min and a return to baseline within 30 min. The i.p. pre-treatment with the histamine H1 receptor antagonist pyrilamine (30 mg/kg) did not inhibit the scratching behavior induced by SLIGRL-NH₂ but significantly inhibited the one induced by histamine. Co-injection of SLIGRL-NH₂ (40 nmol/site) with either the slow-release H₂S donor GYY4137 (1 and 3 nmol/site) or the spontaneous donor NaHS (1 and 0.3 nmol/site) resulted in significantly reduced responses. Pre-treatment with NaHS (0.1 and 0.3 nmol / site), but not with GYY4137, also resulted in significant reduction of the scratching behavior. Co-treatment with the K_{ATP} channel blocker glibenclamide (200 nmol/site) abolished the antipruritic effects of H₂S. Co-injection of the non-enzymatic nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusiato (10 nmol/site) significantly reversed the antipruritic effect of H₂S; however, this effect was independent of soluble guanylyl cyclase stimulation as co-treatment with the specific enzyme inhibitor ODQ (3-30 µg/site) had no significant effects on the antipruritic actions of H₂S. Western blot assays showed that both PAR-2 and transient receptor potential ankyrin type 1 receptor (TRPA1) are constitutively expressed in the skin of mice. The TRPA1 antagonist HC-030031 (20 µg/site) significantly reduced SLIGRL-NH₂-induced scratching behavior; however the scratching behavior induced by the TRPA1 agonist AITC (1000 nmol/site) was not affected by H₂S. In conclusion, our data show that pruritus secondary to PAR-2 activation can be reduced by H₂S, which acts through K_{ATP} opening and involves NO in a cGMP-independent manner. Furthermore, TRPA1 receptor may mediate the pruritus induced by activation of PAR-2, but H₂S but does not interfere with this pathway. We believe that these results provide support for the development of new treatments for pruritus, mainly that unresponsive to anti-histamines.

Keywords: Pruritus. Protease-activated receptor 2 (PAR-2). SLIGRL-NH₂. Hydrogen sulfide (H₂S). Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática das vias de condução do prurido	22
Figura 2 - Mecanismo de ativação dos receptores ativados por proteases (PARs)	27
Figura 3 - Biossíntese de H ₂ S em mamíferos	33
Figura 4 - Resposta de coçar ao peptídeo SLIGRL-NH ₂	45
Figura 5 - Comportamento de coçar induzido pela histamina	46
Figura 6 - Efeito do bloqueio do receptor H1 no comportamento de coçar evocado pelo peptídeo SLIGRL-NH ₂ e pela histamina	47
Figura 7 - Efeito do GYY4137, liberador lento de H ₂ S, sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH ₂	49
Figura 8 - Efeito do NaHS, liberador espontâneo de H ₂ S, sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH ₂	51
Figura 9 - Participação dos canais de K _{ATP} no mecanismo de ação de NaHS	52
Figura 10 - Envolvimento da via cGMP no mecanismo de ação de NaHS	53
Figura 11 - Participação da via óxido nítrico no mecanismo de ação de NaHS	54
Figura 12 - Efeito do antagonista do TRPA1 sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH ₂	55
Figura 13 - Resposta de coçar secundária à ativação ou bloqueio do TRPA1	57
Figura 14 - Efeito do NaSH sobre o comportamento de coçar induzido por AITC ..	58
Figura 15 - Expressão proteica do receptor PAR-2 em pele de camundongos	59
Figura 16 - Expressão proteica do receptor TRPA1 em pele de camundongos	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Receptores e agonistas que medeiam o prurido em neurônios sensoriais	23
Tabela 2 - Receptores ativados por protease (PARs), ligantes e proteases ativadoras	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-MST	3-mercaptopiruvato sulfutransferase
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
BK	Bradicinina
CAT	Cisteína aminotransferase
CBS	Cistationina β -sintase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMH	Fibras C mecanicamente sensíveis
CMi	Fibras C mecanicamente insensíveis
CSE	Cistationina γ -liase
CO	Monóxido de carbono
DAG	Diacilglicerol
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ET-1	Endotelina 1
GCs	Guanilil ciclase solúvel
GMPc	Guanosina-3',5'-monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
i.d.	Intradérmica
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
K _{ATP}	Canais de potássio dependentes de ATP
LTB4	Leucotrieno B4
Mrgpr	Receptores acoplados a proteína G relacionados a Mas
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
PAR-2	Receptor ativado por protease tipo 2
PG	Prostaglandina
PIP2	Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinase A

PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
SLIGRL-NH ₂	Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-NH ₂
SNP	Nitroprusiato de sódio
SP	Substância P
TLR	Receptores tipo toll
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina tipo 1
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Bases neurofisiológicas do prurido.....	17
1.2 Receptor ativado por proteases do tipo 2 (PAR-2)	26
1.3 Função biológica do sulfeto de hidrogênio (H₂S).....	31
2 OBJETIVOS.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Animais.....	37
3.2 Indução do comportamento de coçar	37
3.3 Tratamentos farmacológicos.....	38
3.3.1 <i>Análise do envolvimento da via histaminérgica no comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂</i>	<i>38</i>
3.3.2 <i>Avaliação do efeito dos doadores de H₂S, de liberação lenta e liberador espontâneo, sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂.....</i>	<i>38</i>
3.3.3 <i>Estudo da participação dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) no mecanismo de ação de H₂S no prurido induzido.....</i>	<i>39</i>
3.3.4 <i>Avaliação do envolvimento da via guanosina monofosfato cíclico (cGMP) no mecanismo de ação de H₂S no prurido induzido.....</i>	<i>39</i>
3.3.5 <i>Análise do envolvimento do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação de H₂S no prurido induzido.....</i>	<i>39</i>
3.3.6 <i>Estudo da participação do receptor de potencial transitório anquirina-1 (TRPA1) no comportamento de coçar induzido pela ativação do PAR-2 e no efeito protetor dos doadores de H₂S</i>	<i>40</i>
3.4 Experimentos ex-vivo.....	41
3.4.1 <i>Deteção da expressão proteica dos receptores PAR-2 e TRPA1 em pele de camundongos pela técnica de Western Blot</i>	<i>41</i>
3.5 Drogas e reagentes	42
3.6 Análise estatística	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Comportamento de coçar na pele de camundongos	44
4.1.1 <i>Comportamento de coçar induzido pela injeção i.d. do peptídeo SLIGRL-NH₂.....</i>	<i>44</i>
4.2 Participação da via histaminérgica no comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂	46

4.2.1	<i>Comportamento de coçar evocado pela histamina na pele da região dorsal de camundongos.....</i>	<i>46</i>
4.2.2	<i>Efeito do tratamento com pirilamina (antagonista seletivo do receptor H1) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (agonista PAR-2) e pela histamina</i>	<i>47</i>
4.3	Efeito da administração de doadores de H₂S no comportamento de coçar evocado pelo peptídeo SLIGRL-NH₂.....	48
4.3.1	<i>Efeito do tratamento com GYY4137 (doador de liberação lenta de H₂S) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂</i>	<i>48</i>
4.3.2	<i>Efeito do tratamento com NaHS (doador espontâneo de H₂S) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (agonista PAR-2) ..</i>	<i>50</i>
4.4	Envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) no mecanismo de ação do H₂S na redução do prurido induzido	52
4.4.1	<i>Efeito do tratamento com glibenclamida (bloqueador específico dos canais K_{ATP}) no efeito antipruriginoso de NaHS no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂.....</i>	<i>52</i>
4.5	Participação da via guanosina monofosfato cíclico (cGMP) no mecanismo de ação do H₂S na redução do prurido induzido.....	53
4.5.1	<i>Efeito do tratamento com ODQ (inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel) no efeito antipruriginoso de NaHS no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂</i>	<i>53</i>
4.6	Envolvimento do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação do H₂S na redução do prurido induzido	54
4.6.1	<i>Efeito do tratamento com nitroprusiato de sódio (SNP) no efeito antipruriginoso do NaHS no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂.....</i>	<i>54</i>
4.7	Envolvimento do TRPA1 no comportamento de coçar induzido pela ativação do PAR-2 e no efeito protetor dos doadores de H₂S	55
4.7.1	<i>Efeito do tratamento com HC-030031 (antagonista TRPA1) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂</i>	<i>55</i>
4.7.2	<i>Comportamento de coçar na pele da região dorsal em camundongos induzido pela ativação ou bloqueio do TRPA1</i>	<i>56</i>
4.7.3	<i>Efeito do tratamento com NaHS (doador de liberação rápida de H₂S) sobre o comportamento de coçar induzido pela ativação do TRPA1</i>	<i>58</i>
4.8	Expressão proteica dos receptores PAR-2 e TRPA1 em pele de camundongos.....	59
4.8.1	<i>Receptor PAR-2</i>	<i>59</i>
4.8.2	<i>Receptor TRPA1</i>	<i>60</i>

5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bases neurofisiológicas do prurido

O prurido (ou coceira) foi definido por Hafenreffer em 1660, como “uma sensação desagradável na pele que conduz ao desejo de se coçar” (Rothman, 1941). Posteriormente, devido a que a palavra “desagradável” pode ser subjetiva, Savin (1998), sugeriu a definição da coceira como “uma sensação que, se for suficientemente forte, provocará o reflexo ou o desejo de coçar-se”.

O prurido atua como um mecanismo fisiológico de defesa contra a ação de agentes nocivos externos, porém, quando se torna exacerbado interfere na qualidade de vida do indivíduo (Ständer et al., 2003). Pode ser classificado como agudo ou crônico, sendo crônico quando tem duração de mais de seis semanas (Ständer et al., 2007); o prurido agudo é frequentemente induzido por picadas de insetos, doenças infecciosas da pele ou também pode ser associado com a ingestão de drogas como o analgésico morfina ou o antimalárico cloroquina (Han, Dong, 2014; Ikoma et al., 2006; Weisshaar, Dalgard, 2009; Weisshaar, Matteredne, 2014); o prurido *per se* não é uma doença, mas é um sintoma que predomina em muitas doenças inflamatórias crônicas da pele, tais como pele seca, urticaria, dermatite atópica e psoríase, mas também ocorre na presença de doenças sistêmicas, por exemplo doença renal crônica, colestase e cirrose biliar primária; doenças neurológicas como compressão ou lesão de nervo e doenças psiquiátricas como o transtorno obsessivo compulsivo (Han, Dong, 2014; Ständer et al., 2007, 2008; Twycross et al., 2003).

Os dados epidemiológicos para o prurido têm sido reportados por vários grupos. Um dos estudos de prevalência de prurido na população geral foi realizado na Noruega, onde foi encontrado que 8.4% das pessoas pesquisadas tinham experimentado coceira na última semana (Dalgard et al., 2004). Na Alemanha um estudo na população geral mostrou que 16.4% dos indivíduos tinham sofrido de prurido crônico nos últimos 12 meses e 22% dos indivíduos tinham sofrido de prurido crônico alguma vez na vida (Matteredne et al., 2011). Na França, um estudo achou que 32.1% da população geral experimentou coceira nos últimos 7 dias (Misery et al., 2012). Nos Estados Unidos um estudo recente usou dados retrospectivos de visitas médicas ambulatoriais, encontrando que a coceira foi codificada como sintoma em

1% de todos os atendimentos ambulatoriais, ou seja, cerca de sete milhões de visitas por ano (Shive et al., 2013). Em pacientes com doenças específicas como dermatite atópica, o prurido é relatado como um sintoma diário em 91% dos pacientes (Dawn et al., 2009); em pacientes com psoríase a incidência de coceira é de 79% (Krueger et al., 2001); 68% de pacientes com urticaria idiopática crônica reporta prurido que ocorre diariamente (Yosipovitch et al., 2002); a prevalência de prurido em pacientes com doença renal crônica e pacientes com hemodiálise varia entre 10% e 90% (Feramisco et al., 2010; Pisoni et al., 2006); 25% a 70% de pacientes com cirrose biliar primária e 15% de pacientes com hepatite C sofre de prurido crônico (Rishe et al., 2008; Weisshaar, Dalgard, 2009). Prurido também é comum em HIV, 31% de pacientes com terapia antirretroviral reporta prurido (Blanes et al., 2012). Em geral a incidência de prurido crônico é elevada sob uma variedade de condições diferentes (Akiyama, Carstens, 2013).

Estudos iniciais consideraram o prurido como uma submodalidade da dor (teoria da intensidade), isto é, um estímulo nocivo fraco produziria uma ativação de baixo nível dos nociceptores, que resultaria em sensação de prurido, enquanto que um estímulo nocivo mais forte promoveria a ativação mais intensa dos nociceptores, provocando a dor (Bíró et al., 2007; Ikoma et al., 2003; Schmelz, 2002; Von Frey, 1922). Se for periférico, prurido e dor têm muitas características em comum. Ambas as sensações tem receptores, aparentemente idênticos, em terminações nervosas sensoriais não mielinizadas (fibras C) com axônios que entram no corno dorsal da medula espinal; ambas as sensações tem vias neurais de transmissão que ascendem pelo trato espinotalâmico contralateral para o tálamo. No entanto, experimentos em humanos demonstraram que o prurido não pode ser transformado em dor e a estimulação dos fascículos que conduzem à dor não pode evocar o prurido, portanto provavelmente duas sensações distintas interagem (Akiyama, Carstens, 2014; Greaves, 2010; Patel, Dong, 2010).

Schmelz et al. (1997) usando a microneurografia para mensurar a atividade de fibras cutâneas em humanos, identificaram uma pequena população de fibras C sensíveis à histamina, que têm propriedades distintas de outras populações de nociceptores, como insensibilidade a estímulos mecânicos, alto limiar de ativação elétrica, velocidade de condução baixa e grandes áreas de inervação, cuja ativação está paralelamente associada com o desencadeamento da sensação de coceira. Complementando esses resultados, Andrew e Craig (2001), utilizando a medula

espinhal de gatos, identificaram um tipo de neurônios da lâmina I do trato espinotalâmico (STT), que respondem a aplicação por iontoforese de histamina na pele, mas não são sensíveis a estímulos mecânicos ou térmicos, que normalmente induzem a dor. Essas descobertas providenciam suporte à hipótese da existência de um sistema pruriceptivo autônomo organizado independentemente da sensação da dor (teoria da especificidade; em inglês “labeled line theory”), que emprega moléculas específicas, estruturas de receptores especializados, fibras nervosas sensoriais específicas, vias neurais específicas e centros superiores que processam exclusivamente coceira mais não dor, sem sobreposição entre os dois sistemas (Andrew, Craig, 2001; Bíró et al., 2007; Patel, Dong, 2010; Schmelz et al., 1997). Contudo, este modelo parece ser incompatível com a observação de que as supostas fibras específicas para coceira também respondem às substâncias algogênicas como bradicinina e capsaicina e que a dessensibilização das fibras nervosas sensoriais (que expressam o receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1; TRPV1) pela capsaicina provoca perda tanto da sensação de coceira quanto da nocicepção (Imamachi et al., 2009; Patel, Dong, 2010; Schmelz et al., 2003).

Estas duas teorias, da intensidade e da especificidade, não conseguem explicar algumas observações experimentais como o fato de que a coceira é aliviada pelo ato de coçar ou pela aplicação de calor, frio ou substâncias químicas que induzem dor. Por outro lado, os agonistas μ -opióides, como a morfina, atenuam a dor, mas ao mesmo tempo induzem o prurido. Deste modo, provavelmente a coceira e dor são sensações distintas que interagem (Davidson et al., 2009; Ikoma et al., 2006).

A histamina tem sido a ferramenta preferida para estudar o mecanismo neuronal da sensação de coceira, já que produz coceira de forma fiável após a injeção intradérmica, que em geral, é acompanhado por eritema e pápula. A histamina ativa diretamente os receptores H1 presentes nas fibras C mecanicamente insensíveis, e sua ação é efetivamente bloqueada por antagonistas seletivos dos receptores H1 (anti-histamínicos), os quais são usados como tratamento padrão para coceira clínica (Twycross et al., 2003). No entanto, estudos recentes identificaram um novo subtipo de receptor para histamina, o receptor H4, que também está implicado na sensação de coceira (Dunford et al., 2007). Adicionalmente, evidências indicam a existência de subtipos de fibras pruriceptivas que são insensíveis à histamina, sugerindo mecanismos não-histaminérgicos da

coceira (Hägermark, 1973; Ikoma et al., 2006; Shelley, Arthur, 1955). Tais descobertas podem ser a explicação para as condições clínicas de coceira que não respondem ao tratamento com anti-histamínicos.

Shelley e Arthur (1955) evidenciaram que a inserção de espículas do feijão-da-florida (*Mucuna pruriens*; em inglês “cowhage”) na pele superficial, produz coceira intensa, e o agente pruritogênico ativo foi identificado como uma protease nomeada mucunaína. Esta coceira pode ser acompanhada por eritema localizado e edema de poucos milímetros, mas sem produzir a pápula associada à histamina (Johanek et al., 2007). Para elucidar as características das fibras nervosas responsáveis da coceira induzida pela ação da mucunaína, foram realizados registros eletrofisiológicos; Tuckett e Wei (1987) registraram a atividade das fibras A e C em gatos e descobriram que apenas as fibras C mecanicamente sensíveis ou polimodais foram ativadas pela aplicação do feijão-da-florida. Resultados similares foram descritos em macacos e em humanos (Johanek et al., 2008; Namer et al., 2008). Estudos recentes identificaram a mucunaína como uma cisteíno-protease, que é capaz de clivar e ativar receptores ativados por proteases (PARs) dos tipos 2 (PAR-2) e 4 (PAR-4; Reddy et al., 2008).

A sensação de coceira, assim como a sensação de dor, é iniciada nos neurônios aferentes primários pruriceptivos que transmitem a informação da periferia até o sistema nervoso central (Ikoma et al., 2006). Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários situam-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e no gânglio trigêmeo (Han, Dong, 2014).

Os neurônios aferentes primários estão classificados em três categorias: 1) de grande diâmetro, fibras A α e A β , que apresentam camada espessa de mielina, alta velocidade de condução e são responsáveis pela transmissão das informações proprioceptivas, como toque leve e pressão; 2) de diâmetro médio, fibras A δ , finamente mielinizadas e de condução semirrápida, respondem a estímulos mecânicos intensos, porém são diferenciadas por seus limiares distintos a estímulos térmicos em tipo I ou tipo II, são responsáveis de uma resposta rápida que resulta na dor aguda; 3) de pequeno diâmetro, fibras C, amielínicas, com velocidade de condução lenta, são responsáveis de uma resposta duradoura que resulta na dor difusa, geralmente secundária à dor aguda. As fibras C são o principal mediador da sensação de coceira (Almeida et al., 2004; Han, Dong, 2014; Julius, Basbaum,

2001). Entretanto, estudos mais recentes demonstram que as fibras A δ também estão envolvidas na percepção de coceira (Ringkamp et al., 2011).

As fibras C podem ser divididas em duas classes com base na resposta a estímulos mecânicos: 1) fibras C mecanicamente insensíveis (CMi), que não respondem a estímulos mecânicos, porém, respondem ao calor e vários estímulos químicos nocivos (como a capsaicina) e são consideradas como quimiorreceptores; 2) fibras C mecanicamente sensíveis (CMH), que são polimodais, isto é, respondem a estímulos mecânicos, calor e produtos químicos nocivos. Nos seres humanos, as CMi ocupam grandes áreas ($\sim 5 \text{ cm}^2$) de campo receptivo e as CMH, pequenas áreas ($\sim 2 \text{ cm}^2$) de campo receptivo, medidos na pele da perna ou do pé (Schmidt et al., 2002). Aproximadamente 20% de CMi respondem à aplicação de histamina (fibras C mecanicamente insensíveis e histamina positivos, CMi_{His+}), e em contraste, o feijão-da-flórida não produz resposta. As CMH respondem à aplicação do feijão-da-flórida e são apenas fracamente ativados pela histamina (Johanek et al., 2008; Namer et al., 2008; Schmelz et al., 1997, 2003). Assim, CMi_{His+} desempenham um papel importante na coceira induzida por histamina, mas não estão envolvidos na coceira produzida por espículas do feijão-da-flórida, enquanto que CMH medeiam a coceira não histaminérgica induzida pelas espículas do feijão-da-flórida (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração esquemática das vias de condução do prurido. (a) Ativação de fibras C polimodais (CMH) por pruritogenos não-histaminérgicos. Cowhage libera mucunaina, uma protease que cliva e ativa os receptores ativados por protease-2 (PAR-2) localizados no terminal periférico. (b) Ativação de fibras C mecanicamente insensíveis (CMiHis+) pela histamina. Histamina, normalmente liberada por mastócitos, ativa os receptores H1 e H4, esta ativação induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios como CGRP. (c) Ambas as fibras C polimodais e CMiHis+ fazem sinapses no corno dorsal da medula espinal com diferentes populações de neurônios que continuam a via pelo trato espinotalâmico até o tálamo.

Fonte: Davidson e Giesler, 2010.

Estudos moleculares, genéticos e comportamentais mais modernos identificaram muitos sistemas de receptores e canais iônicos funcionalmente expressos nestas fibras nervosas sensoriais, incluindo os receptores de histamina (H1 e H4), receptores ativados por protease (PAR-2 e PAR-4), receptores acoplados a proteína G relacionados a Mas (MrgprA3, MrgprD e MrgprC11 em roedores equivalente a MrgprX1 em humanos), receptores de serotonina (5-HT1 e 5-HT2), receptores de endotelina-1 (ET-A e ET-B), receptores tipo toll (TLR3 e TLR7), receptores de ácidos biliares (TGR5), receptores de potencial transitório anquirina-1 e vaniloide-1 (TRPA1 e TRPV1). Todos estes receptores são ativados por diversos mediadores (Tabela 1), e contribuem para a indução ou transdução da coceira (Han, Dong, 2014; Liu, Ji, 2013; Patel, Dong, 2011; Ständer et al., 2008). A maioria dos mediadores não são específicos, ou seja, separados para a coceira ou para a dor, já que muitos mediadores que induzem coceira como a histamina, serotonina (5-HT) e endotelina 1 (ET-1) também estão envolvidos na indução da dor. Por outro lado, muitos receptores ou canais iônicos como TRPA1 e TRPV1 que estão envolvidos na

transdução de dor, também desempenham papéis cruciais na transdução da coceira. (Bíró et al., 2007; Imamachi et al., 2009; Ross, 2011; Schmelz et al., 2003, Sikand et al., 2009).

Tabela 1 - Receptores e agonistas que medeiam o prurido em neurônios sensoriais

Receptor	Agonistas
H1, H4	Histamina
PAR-2	Catepsina S, mucunaína, tripsina, triptase, SLIGKV-NH ₂ (h), SLIGRL-NH ₂ (c)
PAR-4	Catepsina G, mucunaína, plasmina, tripsina, trombina
MrgprA3	Cloroquina
MrgprC11 (c), MrgprX1 (h)	BAM8-22, SLIGRL-NH ₂
MrgprD	β-alanina
5-HT1, 5-HT2	Serotonina, 12(S)-HPETE
ET-A, ET-B	Endotelina 1
TLR3	Ácido Poli-inosínico:policitidílico
TLR7	Imiquimod
TGR5	Ácidos biliares
TRPA1	Alil isotiocianato, cinamaldeído
TRPV1	Capsaicina

(h) humanos; (c) camundongos.

Fonte: Adaptada de Bautista et al., 2014.

Vários estudos têm fornecido informações sobre os mecanismos envolvidos na transdução da sensação de coceira na periferia. Shim et al. (2007) demonstraram que a histamina ativa o receptor H1, que é um receptor acoplado a proteína G localizado nas fibras nervosas sensoriais, e estimula a ativação da fosfolipase A2 (PLA2), 12-lipoxigenase e TRPV1 para a indução da coceira. A histamina também ativa a via da fosfolipase Cβ3 (PLCβ3), levando a um aumento do cálcio intracelular nos gânglios da raiz dorsal via TRPV1 (Han et al., 2006; Figura 1b). O envolvimento de Pirt (regulador da interação fosfatidilinositol do TRP) na transdução da coceira histaminérgica e não histaminérgica foi reportado por Patel et al. (2011). A Pirt é uma proteína que se liga a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), TRPV1 e outros canais iônicos para potenciá-los, e neste estudo foi mostrado que camundongos com deficiência de Pirt exibiram uma perda significativa do comportamento de coçar

evocado pela histamina, 5-HT, ET-1 e cloroquina; ao contrário, o comportamento de coçar induzido pelo agonista PAR-2 SLIGRL-NH₂ não foi reduzido.

No corno dorsal da medula espinal os neurotransmissores envolvidos na transmissão da coceira também têm sido investigados. Sun e Chen (2007) indicaram que o peptídeo liberador de gastrina (GRP) medeia o comportamento pruriginoso em camundongos através do seu receptor GRPR (receptor do peptídeo liberador de gastrina) localizado em fibras da lâmina I e II da medula espinal. Entretanto, estudos em ratos realizados por Koga et al. (2011) propõem que seja o glutamato, e não o GRP, o principal neurotransmissor excitatório de ligação entre os neurônios primários e os neurônios sensíveis a GRP do corno dorsal. Um estudo que envolve o neuropeptídeo substância P (SP) na transmissão da coceira é fornecido por Carstens et al. (2010), onde a ablação de neurônios do corno dorsal, que expressam o receptor de neurocinina-1 (NK-1; receptor da SP), reduziu o comportamento de coçar e a sensação de dor em ratos, sugerindo que esta população de neurônios é crítica para ambas as sensações, coceira e dor. O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) também desempenha um papel na transmissão da coceira na medula espinal conforme descrito por McCoy et al. (2012). Mais recentemente Mishra e Hoon (2013) reportaram um novo neurotransmissor, o neuropeptídeo natriurético polipeptídeo B (Nppb) que está envolvido na transmissão da coceira histaminérgica e não-histaminérgica, mas não na transmissão da dor. O Nppb é expresso em neurônios que co-expressam TRPV1 e PLC β 3, e seu receptor Npra é expresso principalmente na lâmina I da medula espinal. Deste modo, GRP, glutamato, SP, CGRP e Nppb são neurotransmissores liberados dos neurônios aferentes primários e tem papel importante na transmissão da coceira no corno dorsal da medula espinal.

Em fim, a pesar dos avanços obtidos nos últimos anos, o número de receptores, os tipos de mediadores, os mecanismos de transdução e os subtipos de neurônios que participam na produção e transmissão da sensação de coceira ainda não estão claramente elucidados. A via neural que transmite o prurido, e como esta se relaciona com a via que transmite a dor, também é uma questão em estudo.

Uma recente descoberta de Han et al. (2013) indica a existência de um circuito neuronal específico para coceira em camundongos: os neurônios sensoriais primários que expressam o receptor MrgprA3. Estes neurônios são polimodais, coexpressam isolectina B4 (IB4), CGRP, TRPV1, inervam exclusivamente a

epiderme e seus axônios centrais se conectam com neurônios que expressam GRPR no corno dorsal da medula espinal. A ablação de tais neurônios reduz as respostas de coçar a diversos agentes pruritogênicos, sem alterar comportamentos da dor. Curiosamente, Lagerström et al. (2010) e Liu et al. (2010) forneceram provas convincentes de que a via de sinalização da coceira pode ser suprimida por estímulos dolorosos, o que envolve a liberação de glutamato sináptico dependente do transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2) dos neurônios sensoriais que expressam Nav1.8 (um marcador para nociceptores). É importante ressaltar que a perda de VGLUT2 em todos os neurônios do gânglio da raiz dorsal em camundongos, originou animais que eram menos sensíveis à dor, porém mais sensíveis à coceira. Assim, estes estudos apoiariam a hipótese que ressalta a existência de vias neurais separadas, específicas para coceira e dor, as quais estariam interconectadas por interneurônios excitatórios ou inibitórios que modulam a atividade entre ambos (Teoria da seletividade; em inglês: Population coding theory; Handwerker, 2010; Ma, 2012, 2014; McMahon, Koltzenburg, 1992; Wood et al., 2009). Recentemente, esta teoria tem ganhado mais atenção após a identificação de um subconjunto específico de interneurônios inibitórios que podem ajudar a distinguir a dor da coceira. Ross et al. (2010) descobriram uma população de interneurônios inibitórios no corno dorsal de camundongos, cujo desenvolvimento requer a expressão do fator de transcrição Bhlhb5 (neurônios Bhlhb5). Estes interneurônios são estimulados por um conjunto de nociceptores e estão envolvidos na supressão da coceira, e a perda destes neurônios resulta em coceira persistente, sem alterações da resposta à dor.

Em síntese, a sensação de coceira é produzida quando diversos pruritógenos exógenos ou endógenos estimulam os receptores presentes nas fibras nervosas sensoriais da pele e ativam as vias periféricas da coceira; isso provoca uma cascata de sinalização e de potenciais de ação nos neurônios aferentes primários, que conduzem o potencial de ação para o corno dorsal da medula espinal. No corno dorsal os neurônios aferentes primários liberam neurotransmissores tais como CGRP, GRP, SP, glutamato e Nppb, os quais estão implicados na sinapse com os neurônios secundários espinais (Dhand, Aminoff, 2014; Davidson, Giesler, 2010). Os axônios dos neurônios secundários viajam pelo trato espinotalâmico contralateral e fazem sinapse com neurônios de terceira ordem no tálamo, a partir do qual os

axônios projetam difusamente a regiões corticais e subcorticais (Dhand, Aminoff, 2014; Figura 1).

A ação de coçar, crônica ou intensa, pode levar ao desenvolvimento de lesões da pele e liberação de mediadores inflamatórios que, potencialmente, induzem ou agravam o prurido, e avigoram o ato de coçar. Este ciclo “prurido-coçadura-prurido”, infelizmente, é frequentemente resistente à terapia antipruriginosa tópica (corticoides) e sistêmica (anti-histamínicos; Steinhoff et al., 2006). Por essa razão, existe uma necessidade de compreender os mecanismos que estão envolvidos na neurotransmissão do prurido, a fim de desenvolver novos fármacos antipruriginosos que sejam efetivos no tratamento do prurido resistente à farmacoterapia atual. Certamente, foram alcançados grandes avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na transmissão da coceira depois da identificação dos receptores PAR-2 nas fibras nervosas que inervam a pele humana e a demonstração do envolvimento destes receptores na fisiopatologia do prurido em pacientes com dermatite atópica (D'Andrea et al., 1998; Steinhoff et al., 2003).

1.2 Receptor ativado por proteases do tipo 2 (PAR-2)

Os receptores ativados por proteases (PARs) são uma família de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), que são ativados por clivagem proteolítica do extremo N-terminal do mesmo receptor. Deste modo, uma nova sequência N-terminal de ligando ancorado é exposta, a qual se liga à segunda alça extracelular do mesmo receptor e, subsequentemente, o ativa (Figura 2a). Uma ampla gama de proteases pode clivar e ativar PARs, incluindo as proteases da cascata de coagulação, aquelas presentes em células inflamatórias e no trato digestivo. Alguns PARs também podem ser ativados por peptídeos sintéticos com base na sequência do ligando ancorado resultante da clivagem proteolítica (Figura 2b). A ativação do receptor é um processo irreversível e dá início a uma série de acontecimentos de sinalização em muitos tipos de células com diferentes consequências, que vão desde a hemóstase até a transmissão da dor. Essa ativação é finalizada por um mecanismo de internalização e degradação do receptor (Ossovskaya, Bunnett, 2004; Roosterman et al., 2003; Steinhoff et al., 2005).

Figura 2 - Mecanismo de ativação dos receptores ativados por proteases (PARs). (a) Proteases clivam o extremo N-terminal dos PARs na superfície celular, expondo uma nova sequência N-terminal que se liga e ativa o receptor iniciando uma resposta intracelular. (b) Agonistas PARs com sequência de aminoácidos análoga ao do ligando ancorado ativam PARs diretamente induzindo uma resposta intracelular idêntica ao da protease natural.

Fonte: Adaptada de Guenther e Melzig, 2015.

Existem quatro membros conhecidos desta família de receptores ativados por proteases, PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. PAR-1, PAR-3 e PAR-4 são os principais alvos da enzima trombina, uma protease da coagulação; PAR-1 e PAR-4 também são clivados e ativados por outras numerosas proteases (Tabela 2). PAR-2 é insensível à trombina, mas pode ser ativado por uma ampla gama de proteases extracelulares incluindo algumas serino-proteases (KLK5, KLK14, tripsina, triptase, prostasina, matriptase, elastase do neutrófilo e proteinase-3 do neutrófilo), cisteíno-proteases (como a cathepsina S; Gieseler et al., 2013; Rothmeier, Ruf, 2012) e por proteases exógenas produzidas por agentes microbianos, tais como ácaros (antígeno Der p1), algumas bactérias (toxinas de *Staphylococcus aureus*) e provavelmente alguns parasitas (Shpacovitch et al., 2007). PAR-2 também é ativado

por cisteíno-proteases derivadas de plantas, tais como mucunaína (feijão-da-flórida), bromelina (talo do abacaxi), ficina (látex da figueira) e papaína (mamão; Reddy et al., 2008; Reddy, Lerner, 2010). Em humanos, as proteases clivam PAR-2 entre os aminoácidos arginina da posição 36 e serina da posição 37 para expor a nova sequência N-terminal (Guenther, Melzig, 2015). A ativação do PAR-2 também pode ser mediada por peptídeos sintéticos da sequência do ligando ancorado, o peptídeo Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu (SLIGRL-NH₂) em ratos e camundongos e Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val (SLIGKV-NH₂) em humanos (al-Ani et al., 1995; Bohm et al., 1996b). Estes agonistas sintéticos constituem importantes ferramentas farmacológicas para o estudo dos receptores PARs.

Tabela 2 - Receptores ativados por protease (PARs), ligantes e proteases ativadoras

	Sequência ligante	Proteases ativadoras
PAR-1	SFLLR-NH ₂ (h) SFLLR-NH ₂ (r)(c)	Trombina, tripsina, fator Xa, plasmina, proteína C ativada, metaloproteinase-1 da matriz, calicreínas, granzima A
PAR-2	SLIGKV-NH ₂ (h) SLIGRL-NH ₂ (r)(c)	Tripsina, triptase, calicreínas, prostasina, matriptase, catepsina S, elastase do neutrófilo, proteinase-3, fator VIIa, fator Xa, acrosina, antígeno Der p1, mucunaína
PAR-3	TFRGAP-NH ₂ (h) SFNGGP-NH ₂ (c)	Trombina
PAR-4	GYPGQV-NH ₂ (h) GFPGKP-NH ₂ (r) GYPGKF-NH ₂ (c)	Trombina, tripsina, plasmina, catepsina G, fator Xa, calicreínas, mucunaína

(h) humanos; (r) ratos; (c) camundongos.

Fonte: Adaptada de Adams et al., 2011; Gieseler et al., 2013.

A ativação do PAR-2 está ligada à ativação da proteína G acoplada ($G\alpha_q$, $G\alpha_i$ e $G\alpha_{12/13}$), induzindo a ativação das respectivas vias de sinalização intracelular. $G\alpha_q$ conduz ao incremento dos níveis intracelulares de cálcio $[Ca^{2+}]_i$, $G\alpha_i$ inibe a via adenilato ciclase-cAMP-MAPK e $G\alpha_{12/13}$ medeia o incremento da atividade de Rho-quinase (Zhao et al., 2014a). Os peptídeos agonistas SLIGRL-NH₂ e SLIGKV-NH₂ ativam a via da proteína $G\alpha_q$, que envolve a ativação da fosfolipase C que, por sua vez, gera diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) a partir da hidrólise de

fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) os quais induzem à mobilização de cálcio intracelular e, por outra parte, à ativação da proteína quinase C (PKC; Adams et al., 2011; Zhao et al., 2014a).

Depois de ter sido ativado, o PAR-2 sofre fosforilação do domínio citoplasmático, e seguidamente, as β -arrestinas são deslocadas do citosol até a membrana plasmática para interagirem com os receptores PAR-2 fosforilados, o que resulta no desacoplamento e dessensibilização do receptor. Este complexo β -arrestina-PAR-2 é acoplado às clatrininas, que são necessárias para a endocitose do receptor. Depois de internalizados, os receptores são degradados pelos lisossomos (Déry et al., 1998; Roosterman et al., 2003; Rothmeier, Ruf, 2012). Além da função na internalização, as β -arrestinas tem outro papel na sinalização do PAR-2 que é uma via independente da proteína G. O complexo formado por β -arrestina-PAR-2 inicia a sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK-ERK1/2) importantes para a regulação da migração celular e regula negativamente as vias de sinalização dependentes de proteína G (Rothmeier, Ruf, 2012).

PAR-2 é composto por 397 aminoácidos e encontra-se expresso amplamente em muitos tecidos como cérebro, pulmão, estômago, cólon, vagina, pele e por diferentes tipos de células, incluindo queratinócitos suprabasais, células endoteliais, fibroblastos, cardiomiócitos, células da glia, mastócitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e fibras nervosas sensoriais (Böhm et al., 1996a; Guenther, Melzig, 2015). PAR-2 tem varias funções fisiológicas e fisiopatológicas nos órgãos e sistemas, diversos estudos indicam que a ativação do PAR-2 desempenha um papel importante na inflamação, na mediação da dor, na reação alérgica, na isquemia cardíaca, na artrite reumática, na doença de Alzheimer, assim como na progressão do tumor (Crilly et al., 2012; Ebert et al., 2014; Guenther, Melzig, 2015; Kempkes et al., 2012; Lam et al., 2012; Seeliger et al., 2003). Estudos também sugerem que a ativação do PAR-2 pode provocar coceira, de fato, este receptor esta envolvido na fisiopatologia da coceira em pacientes com dermatite atópica e em pacientes em hemodiálise (Dugas-Breit et al., 2005; Steinhoff et al., 2003). PAR-2 induz coceira diretamente pela ativação do receptor nas fibras nervosas sensoriais que inervam a pele, ou indiretamente pela ativação de queratinócitos ou células do sistema imunológico (mastócitos, neutrófilos e células dendríticas), induzindo a liberação de pruritógenos que ativam as fibras nervosas sensoriais na pele (Akiyama et al., 2009; Akiyama et al., 2010c; Akiyama et al., 2012; Steinhoff et al., 2003). Na coceira, PAR-

2 também tem um papel na sensibilização periférica: as terminações nervosas sensoriais quando são estimuladas por PAR-2 tornam-se mais sensíveis a vários pruritógenos não histaminérgicos (Akiyama et al., 2012).

A ativação do PAR-2 em queratinócitos induz a liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) que provoca coceira através da ativação dos receptores BLT-1 (receptor para LTB₄) expressos nas fibras nervosas sensoriais (Akiyama et al., 2015). A ativação do PAR-2 em queratinócitos também induz a liberação de linfopoietina estromal tímica (TSLP), uma citocina que excita os neurônios sensoriais que coexpressam o receptor para TSLP e TRPA1, para provocar coceira (Wilson et al., 2013b).

Nos neurônios aferentes primários, PAR-2 é coexpresso com TRPA1 e TRPV1 (Dai et al., 2004, 2007), nestes neurônios PAR-2 ativa a fosfolipase C (PLC) que, por sua vez, induz o incremento do cálcio intracelular e despolariza o potencial de repouso de membrana através da inibição de uma corrente de potássio (Davidson, Giesler, 2010; Linley et al., 2008; Kayssi et al., 2007; Steinhoff et al., 2000). No corno dorsal da medula espinhal, o aumento da concentração intracelular de cálcio estimula a liberação de neurotransmissores (GRP, SP, glutamato e Nppb) os quais interagem com seus respectivos receptores expressos em neurônios secundários para a transmissão da coceira (Akiyama, Carstens, 2014; Akiyama et al., 2013). Nas terminações nervosas sensoriais, a ativação do PAR-2 estimula a liberação SP e CGRP as quais, por sua vez, induzem a secreção e ativação de mediadores inflamatórios na periferia, causando inflamação neurogênica, o que pode aumentar a sensibilidade à coceira (Gardell et al., 2008; Grant et al., 2007; Steinhoff et al., 2000).

Uma interação funcional entre PAR-2 e os receptores de potencial transitório (TRPs) tem sido descrita em neurônios aferentes primários, onde a ativação do PAR-2 induz hiperalgesia e dor inflamatória através da ativação de PKC (via PLC) e proteína quinase A (PKA), os quais sensibilizam TRPV1, TRPV4 e TRPA1 (Amadesi et al., 2004, 2006; Chen et al., 2011; Dai et al., 2004, 2007; Grant et al., 2007). Contudo, o mecanismo exato pelo qual PAR-2 interage com TRPs para a indução de coceira ainda não está claro.

SLIGRL-NH₂, o peptídeo agonista do PAR-2, é comumente usado para estudar os mecanismos de coceira não histaminérgica em animais. No entanto um estudo recente mostra que SLIGRL-NH₂ não somente ativa PAR-2, mas também o receptor MrgprC11 (Liu et al., 2011). MrgprC11 é também um receptor acoplado a

proteína G, está presente em neurônios do gânglio da raiz dorsal. MrgprC11 medeia o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo da medula adrenal bovina (BAM8-22), por uma via dependente do TRPA1, em camundongos e humanos (Sikand et al., 2011a; Wilson et al., 2011).

Embora os mecanismos moleculares exatos da coceira induzida por PAR-2 ainda sejam pouco compreendidos, sua relevância clínica em doenças pruriginosas graves na pele humana é indiscutível. Consequentemente, estratégias terapêuticas vêm sendo propostas e investigadas mediante o uso de antagonistas do PAR-2, inibidores dos agonistas PAR-2 e inibidores das vias de sinalização mediadas por PAR-2 (Akiyama et al., 2010b; Nakano et al., 2008; Suen et al., 2012; Ui et al., 2006).

1.3 Função biológica do sulfeto de hidrogênio (H₂S)

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) é um gás incolor, inflamável, solúvel em água com o cheiro característico de ovo podre. Durante várias décadas o H₂S recebeu muita atenção por ser um gás altamente tóxico e assim, como um perigoso contaminante ambiental (Beauchamp et al., 1984). Entretanto, estudos mais recentes mostram que o H₂S também é produzido endogenamente durante o metabolismo da cisteína em mamíferos (Abe, Kimura, 1996; Kamoun, 2004). Semelhante ao óxido nítrico (NO) e ao monóxido de carbono (CO), o H₂S funciona como um gasotransmissor que participa no controle de muitas funções celulares interferindo em processos de sinalização celular (Li et al., 2011).

O H₂S é uma molécula altamente lipofílica e penetra facilmente por difusão passiva a bicamada lipídica das membranas celulares. Embora seja solúvel em água, é muito instável e volátil. Em solução aquosa o H₂S é um ácido fraco, com constantes de dissociação ácida (pKa) de 6,90 e 11,96 a 25 °C. O H₂S pode se dissociar em H⁺ e íon hidrossulfeto (SH⁻), que por sua vez pode se dissociar a H⁺ e íon sulfeto (S²⁻) como mostra a reação seguinte: $H_2S \rightleftharpoons H^+ + HS^- \rightleftharpoons 2H^+ + S^{2-}$. Em sistemas biológicos o H₂S está presente como H₂S e HS⁻, no interior da célula existem quantidades quase iguais de H₂S e HS⁻, e aproximadamente 20% de H₂S e 80% HS⁻ no fluido extracelular e o plasma a 37 °C e pH 7,4 (Wang, 2012; Zheng et al., 2015).

A produção endógena de H_2S em mamíferos é principalmente através de vias enzimáticas responsáveis da metabolização do aminoácido L-cisteína (Figura 3), sendo as principais duas enzimas dependentes de piridoxal-5'-fosfato (vitamina B_6), as enzimas cistationina β -sintase (CBS) e cistationina γ -liase (CSE). A CBS utiliza L-cisteína para produzir H_2S e L-serina, enquanto a CSE forma H_2S , piruvato e amônia diretamente a partir de L-cisteína ou a partir de L-cistina, sendo a tiocisteína um intermediário no processo. Uma terceira via enzimática para a produção de H_2S é a via catalisada pela 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST) / aminotransferase (CAT). O 3MST produz H_2S a partir de 3-mercaptopiruvato (3MP) que é gerado pela CAT a partir de L-cisteína e α -cetoácidos (α -cetobutirato ou α -cetoglutarato) na presença de tiol e agentes redutores (Li et al., 2011; Shibuya et al., 2013; Wang, 2012). O substrato L-cisteína pode ser derivado de fontes alimentares ou liberado de proteínas endógenas, mas também pode ser sintetizado endogenamente a partir da L-metionina por trans-sulfuração, sendo a homocisteína e a cistationina intermediários no processo (Szabó, 2007). Todas as enzimas estão expressas de forma ampla em vários tecidos, no entanto, a via da CBS contribui principalmente para a produção de H_2S endógeno no sistema nervoso central. A CSE é uma das principais enzimas produtoras de H_2S no sistema cardiovascular e o sistema 3MST/CAT no miocárdio (Olas, 2014). Recentemente foi encontrada em roedores uma nova via para a produção endógena de H_2S , a qual usa como substrato o aminoácido D-cisteína envolvendo as enzimas D-amino-oxidase e 3MST (Shibuya et al., 2013).

Além das vias enzimáticas, a produção endógena de H_2S pode ocorrer também via processos não enzimáticos que são menos conhecidos, envolvendo a participação de glicose, glutathione, polissulfuretos orgânicos e inorgânicos e enxofre elementar. Nos eritrócitos, o H_2S pode ser gerado a partir da glicose (via glicólise) ou de fosfogluconato (via NADPH oxidase). Assim, a glicose reage com a metionina, homocisteína e cisteína para produzir os compostos H_2S e metanotiol. O H_2S também é produzido pela redução direta de glutathione e enxofre elementar. A redução do enxofre elementar para H_2S envolve NADH ou NADPH. A formação de H_2S a partir de tiosulfato ocorre via uma reação redutora que envolve piruvato, o qual atua como doador de hidrogênio (Kolluru et al., 2013).

Figura 3 - Biossíntese de H_2S em mamíferos. CBS, cistationina β -sintase; CSE, cistationina γ -liase; MST, 3-mercaptopiruvato sulfutransferase; CAT, cisteína aminotransferase.

Fonte: Wang, 2012.

Uma vez produzido o H_2S pode ser imediatamente liberado para exercer seus efeitos biológicos através da interação com diferentes moléculas sinalizadoras, ou pode ser armazenado no meio intracelular, como ligações de enxofre sulfano ou ácido lábil enxofre, e liberado mais tarde em resposta a um sinal fisiológico (Ogasawara et al., 1994; Wang, 2012).

Três vias de degradação de H_2S têm sido descritas até o momento: 1) oxidação a tiosulfato, sulfito e sulfato na mitocôndria; 2) metilação a metanotiol e dimetil-sulfeto no citosol; 3) formação de sulfemoglobina pela ligação à hemoglobina. A eliminação das substâncias produzidas é feita principalmente na urina, mas também nas fezes e flatos (Guo et al., 2013; Wang, 2012).

O conhecimento das funções biológicas do H_2S endógeno nos diferentes tecidos vem sendo amplamente investigado ao longo dos últimos anos, e devido a que o H_2S pode exercer efeitos importantes sobre uma ampla gama de processos de sinalização intracelular, novas perspectivas terapêuticas vêm sendo propostas pelo uso de compostos doadores de H_2S , principalmente como anti-inflamatório (Ekundi-Valentim et al., 2010; Sivarajah et al., 2009; Zanardo et al., 2006), antinociceptivo (Distrutti et al., 2006a), antiagregante, anticoagulante e antitrombótico (Grambow et

al., 2014; Kram et al., 2013; Zagli et al., 2007), anticancerígeno (Lee et al., 2011), na redução do estresse oxidativo (Yan et al., 2006; Yonezawa et al., 2007), neuromodulação (Abe, Kimura, 1996), vasorregulação (Laggner et al., 2007; Zhao et al., 2001), proteção contra a lesão de reperfusão pós-infarto do miocárdio (Sivarajah et al., 2009), inibição da resistência à insulina (Ali et al., 2007), dentre outras. Um estudo feito por nosso grupo (Rodrigues, 2012) sugere um novo papel fisiológico e terapêutico do H₂S ao mostrar que a injeção intradérmica de doadores de H₂S reduz o prurido e a inflamação decorrentes da administração de histamina ou o composto 48/80 (um indutor da degranulação de mastócitos) na pele de camundongos.

No entanto, o papel dos doadores de H₂S é controverso em algumas funções como na inflamação, sendo que alguns estudos mostram que o H₂S desempenha um papel pró-inflamatório (Dal-Secco et al., 2008; Spiller et al., 2010), ao passo que outros estudos demonstram que o H₂S tem efeitos anti-inflamatórios (Ekundi-Valentim et al., 2010; Mesquita, 2013; Zanardo et al., 2006). Estes resultados díspares podem ser devidos os diversos doadores de H₂S utilizados nas pesquisas; ademais, não está claro se os subprodutos que poderiam se formar juntamente com a geração de H₂S têm efeitos biológicos (Zhao et al., 2014b).

Os mecanismos farmacológicos pelos quais o H₂S exerce seus efeitos não foram totalmente elucidados. Estudos com canais iônicos vêm demonstrando que o H₂S, tanto endógeno quanto exógeno, é capaz de ativar os canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), resultando em hiperpolarização, o que no músculo liso vascular manifesta-se como vasodilatação (Zhao et al., 2001). A modulação de outros tipos de canais como os de Ca²⁺ tipo-T e tipo-L, canais de Na⁺, canais de Cl⁻ e a ativação de receptores como TRPV1 e TRPA1, também foram demonstrados como possíveis mecanismos de ação do H₂S (Guo et al., 2013; Li et al., 2011; Streng et al., 2008). O H₂S é capaz de reduzir a produção ou expressão de vários mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS), bem como inibir a ativação de NF-kB em plasma (Li et al., 2009). H₂S também tem um papel regulatório no metabolismo do óxido nítrico (Kolluru et al., 2013). O H₂S provoca S-sulfidração de um grande número de proteínas celulares um processo potencialmente importante pelo qual o H₂S pode alterar as funções de uma ampla gama de proteínas celulares e enzimas (Mustafa et al., 2009).

Com base nos mecanismos e velocidade de liberação de H₂S, os doadores de H₂S podem ser divididos em três grupos: 1) substâncias inorgânicas ou sais de

sulfeto, tais como hidrossulfeto de sódio (NaHS) e sulfeto de sódio (Na₂S); em hidrólise a pH 7,4 ambas substâncias podem gerar H₂S rapidamente, e são assim chamados de “liberadores rápidos” ou “liberadores espontâneos”; 2) doadores de liberação lenta, são compostos de natureza orgânica representados por GYY4137; comparados com as sais de sulfeto a liberação de H₂S é muito mais lenta e sustentada; 3) drogas híbridas H₂S/anti-inflamatórios não esteroides; geralmente conjugados com DTT (1,2-Ditiol-3-tiona) como os compostos ATB337 (S-Diclofenaco) e ACS14 (S-Aspirina; Wang, 2012; Zhao et al., 2015; Zheng et al., 2015).

Tendo em consideração o potencial terapêutico e o conhecimento limitado sobre os mecanismos de ação dos compostos doadores de H₂S no tratamento do prurido, a execução do presente projeto procura aprofundar a compreensão da farmacologia destes compostos.

2 OBJETIVOS

Investigar os efeitos dos doadores de H_2S sobre o comportamento de coçar induzido pela ativação de receptores PAR-2 pela injeção intradérmica do peptídeo SLIGRL-NH₂ em camundongos, bem como investigar alguns dos possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos.

Para tanto, foram seguidas as seguintes estratégias:

- Verificar o efeito comportamental produzido pela administração intradérmica do peptídeo SLIGRL-NH₂ (agonista PAR-2), no dorso de camundongos.
- Avaliar a participação da histamina no comportamento de coçar induzido pela ativação dos receptores PAR-2.
- Analisar os efeitos do H_2S sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (agonista PAR-2), por intermédio da administração de doadores de H_2S de liberação lenta e liberação espontânea.
- Investigar os possíveis mecanismos de ação farmacológicos dos doadores de H_2S no prurido, destacando os canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), a via óxido nítrico (NO) / guanosina monofosfato cíclico (cGMP), e o receptor de potencial transitório anquirina-1 (TRPA1).
- Verificar a expressão proteica dos receptores PAR-2 e TRPA1 na pele da região dorsal dos camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 machos de 7-10 semanas de vida, provenientes do Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, os quais foram mantidos em grupos de cinco a seis animais por gaiola de polipropileno e receberam água e ração padrão *ad libitum* em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas (claro às 6:00 hs) e com temperatura controlada de 22 ± 2 °C.

Todos os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Protocolo n° 100, fls. 09, livro 03/2013).

3.2 Indução do comportamento de coçar

A indução do comportamento de coçar pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (agonista PAR-2) em camundongos foi realizada de acordo com o método proposto por Kuraishi et al. (1995) e Andoh et al. (1998), com algumas modificações (Dunford et al., 2007).

Um dia antes da realização dos experimentos, a região dorsal do pescoço dos animais foi depilada com ajuda de um barbeador elétrico (Panasonic ER389, Secaucus, NJ, USA). Previamente, os animais foram anestesiados superficialmente, por via inalatória, com isoflurano a 3% em oxigênio. O ensaio comportamental foi realizado em caixas de acrílico (36 x 27 x 23 cm) composta por quatro células individuais (18 x 13.5 x 23 cm), em uma sala isenta de barulho e adaptada para uso de câmera de vídeo. Os animais foram habituados nas caixas, por 30 minutos, um dia antes e no mesmo dia do experimento; depois de este período de habituação, os animais foram removidos das caixas, anestesiados e receberam injeção por via intradérmica (i.d.) na região dorsal do pescoço de 50 µl de SLIGRL-NH₂ (8-80 nmol/sitio) ou o veículo (Tyrode). Imediatamente depois da injeção, os animais foram colocados de volta nas caixas de acrílico e foram filmados durante os 30 minutos seguintes. A reprodução do vídeo serviu para avaliar o comportamento de coçar por parte de pesquisadores treinados, o que foi mensurado com o auxílio de um

contador manual. A medida do comportamento de coçar foi determinada pela contagem do número de ataques de coceira, sendo um ataque de coceira o evento isolado de três ou mais movimentos rápidos de toque com as patas traseiras dirigidas às proximidades da região injetada. Os resultados foram expressos como número de ataques de coceira em 20 min ou a cada 5 min, conforme especificado.

3.3 Tratamentos farmacológicos

3.3.1 *Análise do envolvimento da via histaminérgica no comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂*

A participação da via histaminérgica no comportamento pruriginoso induzido pela ativação do PAR-2 em camundongos C57BL/6 foi investigada através do emprego de histamina e pirilamina (antagonista seletivo do receptor histaminérgico H1).

Com o objetivo de encontrar uma dose capaz de induzir um comportamento de coçar equivalente ao induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio), foi realizada uma curva dose-resposta de histamina (50-1000 nmol/sítio) administrada de forma análoga ao SLIGRL-NH₂. Os animais controle receberam o veículo Tyrode (50 µl/sítio; i.d.)

Para estudar o envolvimento dos receptores H1 na resposta desencadeada pelo peptídeo SLIGRL-NH₂, outro grupo de animais foi pré-tratado com o antagonista seletivo do receptor histaminérgico H1, pirilamina (30 mg/kg) que foi administrado via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 ml/kg, 30 minutos antes da injeção i.d. de SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) ou histamina (300 nmol/sítio). Os animais controle receberam o veículo Tyrode (10 ml/kg; i.p.). A dose de pirilamina foi selecionada a partir de experimento piloto (dados não mostrados).

3.3.2 *Avaliação do efeito dos doadores de H₂S, de liberação lenta e liberador espontâneo, sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂*

A fim de verificar o efeito dos doadores de H₂S sobre as repostas pruriginosas induzidas pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) em camundongos C57BL/6, diferentes grupos de animais receberam por via i.d. o composto GYY4137 (0.01-30

nmol/sítio) ou NaHS (0.01-30 nmol/sítio), doadores de liberação lenta e espontânea de H_2S , respectivamente, os quais foram coinjetados com o estímulo pruriginoso.

Em outra serie de experimentos, diferentes grupos de animais foram pré-tratados por via i.d. 30 minutos antes da injeção do estímulo pruriginoso com GYY4137 (0,01-30 nmol/sítio) ou NaHS (0.03-3 nmol/sítio). Os animais controle receberam o veículo Tyrode (50 μ l/sítio; i.d.).

3.3.3 Estudo da participação dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) no mecanismo de ação de H_2S no prurido induzido

Para investigar o envolvimento dos canais K_{ATP} no efeito antipruriginoso dos doadores de H_2S no prurido induzido pelo agonista do PAR-2, os camundongos foram tratados com o bloqueador específico dos canais K_{ATP} glibenclamida (50-200 nmol/sítio) o qual foi coinjetado via i.d. com o peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) e o NaHS (1 nmol/sítio). Esta dose de NaHS foi selecionada com base nos resultados do experimento anterior (seção 3.3.2) mostrados na Figura 8A e corresponde à dose que causou efeito máximo. Os animais controle receberam o veículo Tyrode (50 μ l/sítio; i.d.).

3.3.4 Avaliação do envolvimento da via guanosina monofosfato cíclico (cGMP) no mecanismo de ação de H_2S no prurido induzido

Para avaliar o possível envolvimento da via cGMP no efeito antipruriginoso do NaHS na coceira induzida pelo agonista do PAR-2, os camundongos foram tratados com o inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ; 3-30 μ g/sítio) dissolvido em solução de Tyrode contendo DMSO à 12.8%, o qual foi coinjetado por via i.d. com o peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) e o NaHS (1 nmol/sítio). Os animais controle receberam o veículo (DMSO à 12.8% em Tyrode; 50 μ l/sítio).

3.3.5 Análise do envolvimento do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação de H_2S no prurido induzido

Com o objetivo de averiguar o possível envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito protetor do NaHS na coceira induzida pela ativação do PAR-2, os

camundongos foram tratados com nitroprusiato de sódio (SNP; 3-30 nmol/sítio), um doador não enzimático de NO, o qual foi coinjetado via i.d. com o peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) e o NaHS (1 nmol/sítio). Os animais controle receberam o veículo Tyrode (50 µl/sítio; i.d.).

3.3.6 Estudo da participação do receptor de potencial transitório anquirina-1 (TRPA1) no comportamento de coçar induzido pela ativação do PAR-2 e no efeito protetor dos doadores de H₂S

O envolvimento do TRPA1 na resposta pruriginosa induzida pela ativação do PAR-2 foi investigado através do emprego de agonista e antagonista seletivos do TRPA1.

Para analisar o envolvimento do TRPA1 no comportamento de coçar induzido pela ativação do PAR-2, camundongos foram tratados com o antagonista de TRPA1 HC-030031 (dissolvido em solução de Tyrode contendo DMSO à 20%; 5-20 µg/sítio) administrado via i.d. 5 minutos antes da injeção do peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio, i.d.). Os animais controle receberam o veículo (DMSO à 20% em Tyrode; 50 µl/sítio).

Para comprovar a seletividade deste antagonista sobre o TRPA1, foi realizada uma curva dose-resposta do agonista seletivo do TRPA1 alil isotiocianato (AITC; 1-1000 nmol/sítio) o qual foi administrado por via i.d. com a finalidade de induzir um comportamento de coçar semelhante ao induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂. Com estes resultados em mãos, um outro grupo de animais foi posteriormente tratado com o antagonista HC-030031 (20 µg/sítio) e após 5 minutos receberam uma injeção i.d. de AITC (1000 nmol/sítio). Os animais controle receberam o veículo (DMSO 20% em Tyrode; 50 µl/sítio).

Com o objetivo de avaliar o efeito dos doadores de H₂S na resposta pruriginosa pela ativação de TRPA1, os camundongos foram tratados com NaHS (0.03-3 nmol/sítio) o qual foi coinjetado via i.d. com o AITC (1000 nmol/sítio). Os animais controle receberam o veículo Tyrode (50 µl/sítio; i.d.).

3.4 Experimentos *ex-vivo*

3.4.1 *Detecção da expressão proteica dos receptores PAR-2 e TRPA1 em pele de camundongos pela técnica de Western Blot*

A técnica de Western Blot foi utilizada com o propósito de verificar a presença dos receptores PAR-2 e TRPA1 na pele dos camundongos C57BL/6 utilizados nos experimentos. Amostras de pele da região dorsal de camundongos foram homogeneizadas em tampão TRIS (50 mM, pH 7.4) contendo 1% de Triton X-100, 0.1% de SDS (dodecil sulfato de sódio), 1 mM de PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoridro) e 0.1% de mistura de inibidor de proteases (P8340; Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4 °C, utilizando um microtritador (DREMEL® 300, Distrito Federal, DF, México). A seguir, as amostras foram centrifugadas a 1000 g por 5 min a 4 °C e os sobrenadantes resultantes foram separados. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Aliquotas dos sobrenadantes foram diluídas em tampão TRIS-HCl (50 mM) e adicionadas de tampão de Laemmli (62.5 mM de TRIS-HCl, pH 6.8 contendo 2% de SDS, 0.01% de azul de bromofenol, 25% de glicerol e 5% de β -mercaptoetanol). Após aquecimento das amostras em banho-maria a 100 °C por 5 min, volumes equivalentes a 5 μ g de proteínas totais (para PAR-2) ou 20 μ g (para TRPA1) foram aplicados na cuba de eletroforese e submetidos a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) à 12.5% (para PAR-2) ou 7% (para TRPA1), usando-se um tampão para eletroforese (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM e SDS 0.1%) e uma corrente constante de 30 mA (PowerPac™ HC, Bio-Rad Laboratories, Inc; Singapur) por 3 horas (para PAR-2) e 2 horas 40 minutos (para TRPA1) (Laemmli, 1970). Após o término da eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas eletroforeticamente (270 mA; 90 min) para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando um sistema molhado (o tampão para transferência consistia em solução de TRIS-HCl 25 mM, contendo 192 mM de glicina, 0.1% de SDS e 18% de etanol absoluto). A eficácia da transferência e a qualidade de carga das proteínas foram comprovadas pela coloração reversível das membranas com o corante Ponceau S a 0.1% em ácido acético à 5% (Romero-Calvo et al., 2010).

A seguir, os sítios de ligação não específicos dos anticorpos primários foram bloqueados por incubação das membranas por 1 hora a temperatura ambiente com tampão TBS-T (TRIS-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0.2%; pH 7.4) contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA) e 0.2% de caseína. Em seguida, as membranas foram incubadas durante toda a noite, a 18 °C e sob agitação, com os anticorpos primários anti-PAR-2 (SAM11; monoclonal de camundongo; catálogo sc-13504, Santa Cruz Biotechnology, Inc; TX, USA) na diluição 1:1500 em TBS-T contendo 1,5% de BSA e 0,1% de caseína, ou TRPA1 (policlonal de coelho; NB100-98841; Novus Biologicals, LLC; CO, USA) na diluição 1:1500 em TBS-T. Após lavagens das membranas com TBS-T sob agitação (6 vezes durante 10 min cada uma), as membranas foram incubadas, durante 2 horas a temperatura ambiente, com diluições 1:4000 em TBS-T dos anticorpos secundários conjugados com peroxidase: cabra anti-camundongo (GAM)-HRP (1721011; Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) ou cabra anti-coelho (GAR)-HRP (1705046; Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) para PAR-2 e TRPA1, respectivamente. Depois de um novo ciclo de lavagens com TBS-T (6x por 10 min) as bandas imunorreativas foram detectadas por quimiluminescência usando solução de revelação ECL e fotodocumentadas com um sistema de imagens ChemiDoc™ MP (Bio-Rad Laboratories, Inc; CA, USA). O peso molecular das bandas foi determinado pelo programa ImageLab™ (Bio-Rad Laboratories, Inc; CA, USA) por comparação das mobilidades eletroforéticas com padrões de peso molecular conhecidos.

3.5 Drogas e reagentes

As seguintes drogas foram utilizadas: Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-NH₂ (SLIGRL-NH₂) obtido da GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA); GYY4137 foi gentilmente doado pelo Prof. Matt Whiteman (University of Exeter, UK); histamina, pirilamina, NaHS, glibenclamida e ODQ foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA); nitroprusiato de sódio foi obtido da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA); AITC e HC-030031 foram obtidos do Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA).

A maioria das drogas foram dissolvidas em solução de Tyrode, exceto o HC-030031 que foi dissolvido em solução de Tyrode contendo 20% de DMSO, e o ODQ que foi dissolvido em solução de Tyrode contendo 12,8% de DMSO.

3.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados apresentados sob a forma de curva temporal (Figura 4A) foram sujeitos à análise de variância de duas vias (two way-ANOVA), seguido do teste de Bonferroni. As diferenças entre grupos experimentais foram sujeitas à análise de variância de uma via (one way-ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett para múltiplas comparações entre os grupos, utilizando o programa GraphPad Prism v.5.01. Valores de P menores de 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Comportamento de coçar na pele de camundongos

4.1.1 *Comportamento de coçar induzido pela injeção i.d. do peptídeo SLIGRL-NH₂*

A injeção intradérmica do peptídeo SLIGRL-NH₂ (8, 24, 40 e 80 nmol/sítio) no dorso de camundongos C57BL/6 provocou um comportamento de coçar de maneira dependente da dose na região injetada, que começou segundos após a injeção, atingiu o pico nos primeiros 10 minutos e retornou ao basal aos 30 min (Figura 4A); a análise do total de ataques de coceira nos 20 min após a injeção mostrou um significativo efeito dependente da dose como observado na Figura 4B. A dose de 40 nmol/sítio foi selecionada para os experimentos seguintes, visto que a resposta induzida por esta dose de SLIGRL-NH₂ é sub-máxima, e assim pode ser tanto inibida como potencializada por outros agentes a serem testados.

Figura 4 - Resposta de coçar ao peptídeo SLIGRL-NH₂. (A) Comportamento de coçar induzido por SLIGRL-NH₂ (8-80 nmol/sítio) durante o curso do tempo. Mostra-se a quantidade de acessos de coceira na região dorsal do pescoço ocorridos a cada 5 min durante o transcurso de 30 min depois da injeção intradérmica (no tempo = 0). Os dados mostram-se como média $\pm$ EPM. (B) Curva dose-resposta para o comportamento de coçar induzido por SLIGRL-NH₂. Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica. **P<0.01, ***P<0.001 significativamente diferente de Tyrode (n = 3-6).

4.2 Participação da via histaminérgica no comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂

4.2.1 Comportamento de coçar evocado pela histamina na pele da região dorsal de camundongos

A histamina (50, 100, 300 e 1000 nmol/sítio) administrada por via intradérmica no dorso de camundongos induziu comportamento de coçar na região injetada comparado com o grupo veículo Tyrode. A análise do total de ataques de coceira durante os 20 min seguintes à injeção mostrou um efeito dependente da dose (Figura 5). A resposta à dose de 300 nmol/sítio de histamina foi semelhante à induzida pela injeção do peptídeo SLIGRL-NH₂, motivo pelo qual esta dose foi a escolhida para os experimentos seguintes.

Figura 5 - Comportamento de coçar induzido pela histamina. Curva dose-resposta para o comportamento de coçar induzido pela histamina (50-1000 nmol/sítio) (n = 5-7). Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica. *P<0.05, ***P<0.001 significativamente diferente de Tyrode.

4.2.2 Efeito do tratamento com pirilamina (antagonista seletivo do receptor H1) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (agonista PAR-2) e pela histamina

Conforme ilustrado na Figura 6, o bloqueio seletivo dos receptores H1 pela administração intraperitoneal (i.p.) de pirilamina (30 mg/kg), 30 minutos antes dos estímulos pruriginosos, não interferiu na resposta induzida pelo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio), mas diminuiu significativamente o número de ataques de coceira produzidos pela injeção i.d. de histamina (300 nmol/sítio). A administração de pirilamina, por si só, na dose testada, não causou alterações significativas no comportamento de coçar em relação ao grupo veículo.

Figura 6 - Efeito do bloqueio do receptor H1 no comportamento de coçar evocado pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ e pela histamina. Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor H1, pirilamina (30 mg/kg, i.p.) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) e pela histamina (300 nmol/sítio) (n = 5-6). Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso. ***P<0.001 significativamente diferente de Tyrode, ###P<0.001 significativamente diferente de histamina.

4.3 Efeito da administração de doadores de H₂S no comportamento de coçar evocado pelo peptídeo SLIGRL-NH₂

4.3.1 Efeito do tratamento com GYY4137 (doador de liberação lenta de H₂S) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂

A curva dose-resposta obtida pelo cotratamento com o doador de liberação lenta de H₂S, GYY4137 mostra que nas doses de 1 e 3 nmol/sítio (i.d.) este composto reduziu significativamente o comportamento pruriginoso induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio, i.d.; Figura 7A). Entretanto, a administração deste composto 30 min antes do estímulo pruriginoso não interferiu com a resposta induzida pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio, i.d.; Figura 7B). Em ambas situações (coadministração ou pré-tratamento), a administração do doador GYY4137, por si só, não induziu comportamento de coçar diferente ao veículo (dados não mostrados).

Figura 7 - Efeito do GYY4137, liberador lento de H_2S , sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL- NH_2 . (A) Efeito do cotratamento com GYY4137 (0.01-30 nmol/sítio) no comportamento de coçar induzido por SLIGRL- NH_2 (40 nmol/sítio) ($n = 4-6$). (B) Efeito do pré-tratamento, 30 min antes, com GYY4137 (0.01-30 nmol/sítio) no comportamento de coçar induzido por SLIGRL- NH_2 (40 nmol/sítio) ($n = 4-8$). Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso. *** $P < 0.001$ significativamente diferente de Tyrode, # $P < 0.05$ significativamente diferente de SLIGRL- NH_2 .

4.3.2 Efeito do tratamento com NaHS (doador espontâneo de H₂S) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (agonista PAR-2)

A curva dose-resposta obtida pelo cotratamento como o doador espontâneo de H₂S, NaHS mostra que nas doses de 0.3 e 1 nmol/sítio (i.d.) este composto reduziu significativamente o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio, i.d.; Figura 8A). Do mesmo modo, a curva dose-resposta obtida pelo pré-tratamento 30 min antes do estímulo pruriginoso, mostra que nas doses de 0.1 e 0.3 nmol/sítio este composto diminuiu significativamente a resposta pruriginosa induzida pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio, i.d.; Figura 8B). Em ambas situações a administração do doador NaHS, por si só, não induziu comportamento pruriginoso diferente ao veículo (dados não mostrados). Foi selecionada a dose de NaHS 1 nmol/sítio, por coinjeção, para investigar os possíveis mecanismos de ação farmacológicos desse doador.

Figura 8 - Efeito do NaHS, liberador espontâneo de H_2S , sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL- NH_2 . (A) Efeito do cotratamento com NaHS (0.01-30 nmol/sítio) no comportamento de coçar induzido por SLIGRL- NH_2 (40 nmol/sítio) ($n = 4-5$). (B) Efeito do pré-tratamento, 30 min antes, com NaHS (0.03-3 nmol/sítio) no comportamento de coçar induzido por SLIGRL- NH_2 (40 nmol/sítio) ($n = 5-6$). Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ significativamente diferente de Tyrode, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ significativamente diferente de SLIGRL- NH_2 .

4.4 Envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) no mecanismo de ação do H_2S na redução do prurido induzido

4.4.1 Efeito do tratamento com glibenclamida (bloqueador específico dos canais K_{ATP}) no efeito antipruriginoso de NaHS no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂

Como mostra a Figura 9, o bloqueador específico dos canais de K_{ATP} , glibenclamida na dose de 200 nmol/sítio, foi capaz de abolir o efeito antipruriginoso do doador de H_2S , NaHS (1 nmol/sítio) no prurido provocado pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio), quando injetados concomitantemente por via i.d. na região dorsal dos camundongos. A administração de glibenclamida, por si só, na dose que se mostrou efetiva, não promoveu comportamento de coçar diferente ao veículo e não modificou significativamente o prurido induzido por SLIGRL-NH₂.

Figura 9 - Participação dos canais de K_{ATP} no mecanismo de ação de NaHS. Efeito do cotratamento com glibenclamida (50-200 nmol/sítio) no efeito antipruriginoso de NaHS (1 nmol/sítio) no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) (n = 5-6). Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso. ***P<0.001 significativamente diferente de Tyrode, # P<0.05 significativamente diferente de SLIGRL-NH₂, &P<0.01 significativamente diferente de NaHS.

4.5 Participação da via guanosina monofosfato cíclico (cGMP) no mecanismo de ação do H₂S na redução do prurido induzido

4.5.1 Efeito do tratamento com ODQ (inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel) no efeito antipruriginoso de NaHS no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂

A administração conjunta por via i.d. de ODQ (inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel) nas doses de 3-30 µg/sítio, não foi capaz de modificar significativamente o efeito antipruriginoso de NaHS (1 nmol/sítio) na coceira evocada pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio). A administração de 30 µg/sítio de ODQ, por si só, não produziu efeito pruriginoso diferente ao veículo e não alterou significativamente o prurido induzido por SLIGRL-NH₂ (Figura 10).

Figura 10 - Envolvimento da via cGMP no mecanismo de ação de NaHS. Efeito do tratamento concomitante com ODQ (3-30 µg/sítio) no efeito antipruriginoso de NaHS (1 nmol/sítio) no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) (n = 6-8). Mostra-se a quantidade total (± EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso. ***P<0.001 significativamente diferente de Tyrode, ##P<0.05 significativamente diferente de SLIGRL-NH₂.

4.6 Envolvimento do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação do H₂S na redução do prurido induzido

4.6.1 Efeito do tratamento com nitroprusiato de sódio (SNP) no efeito antipruriginoso do NaHS no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂

O tratamento com SNP na dose de 10 nmol/sítio (i.d.), inibiu significativamente o efeito antipruriginoso do doador de H₂S, NaHS (1 nmol/sítio) no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio), quando foram administrados concomitantemente por via i.d. na região dorsal dos camundongos. A administração de SNP, por si só, na dose efetiva, não promoveu alterações do comportamento de coçar em relação ao veículo e não modificou significativamente o prurido induzido por SLIGRL-NH₂ (Figura 11).

Figura 11 - Participação do óxido nítrico no mecanismo de ação de NaHS. Efeito do tratamento conjunto com SNP (3-10 nmol/sítio) no efeito antipruriginoso de NaHS (1 nmol/sítio) no prurido induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) (n = 6-7). Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso. ***P<0.001 significativamente diferente de Tyrode, ###P<0.001 significativamente diferente de SLIGRL-NH₂, &P<0.01 significativamente diferente de NaHS.

4.7 Envolvimento do TRPA1 no comportamento de coçar induzido pela ativação do PAR-2 e no efeito protetor dos doadores de H₂S

4.7.1 Efeito do tratamento com HC-030031 (antagonista TRPA1) sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂

Neste experimento foi avaliado o efeito do bloqueio do TRPA1 no comportamento de coçar induzido pelo agonista do PAR-2 em camundongos. O tratamento, 5 minutos antes, com o antagonista do TRPA1, HC-030031 (20 µg/sítio) injetado via i.d. no dorso de camundongos reduziu significativamente (em 70.1%) o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio, i.d.). A injeção de HC-030031, por si só, na dose de 20 µg/sítio, não promoveu alterações significativas do comportamento de coçar em relação ao grupo veículo (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do antagonista do TRPA1 sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂. Efeito do tratamento com HC-030031 (5-20 µg/sítio) no comportamento de coçar induzido por SLIGRL-NH₂ (40 nmol/sítio) (n = 5). Mostra-se a quantidade total (± EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso. ***P<0.01 significativamente diferente de Tyrode, #P<0.05 significativamente diferente de SLIGRL-NH₂.

4.7.2 Comportamento de coçar na pele da região dorsal em camundongos induzido pela ativação ou bloqueio do TRPA1

A análise do total de ataques de coceira nos 20 min após a injeção intradérmica do agonista do TRPA1: AITC (1, 10, 100, 300 e 1000 nmol/sítio) no dorso de camundongos, mostrou um significativo efeito pruriginoso na dose de 1000 nmol/sítio (Figura 13A). Além disso, o tratamento 5 minutos antes com o antagonista do TRPA1, HC-030031 (20 µg/sítio; i.d.) mostrou uma diminuição estatisticamente significativa do comportamento de coçar induzido por 1000 nmol/sítio de AITC (Figura 13B).

Figura 13 - Resposta de coçar secundária à ativação ou bloqueio do TRPA1. (A) Curva dose-resposta para o comportamento de coçar induzido por AITC. Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica ($n = 5-6$). (B) Efeito do tratamento, 5 min antes, com HC-030031 (20 μ g/sítio) no comportamento de coçar induzido por AITC (1000 nmol/sítio) ($n = 5$). Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso. ** $P < 0.01$ significativamente diferente de Tyrode, # $P < 0.05$ significativamente diferente de AITC.

4.7.3 Efeito do tratamento com NaHS (doador de liberação rápida de H_2S) sobre o comportamento de coçar induzido pela ativação do TRPA1

Com o objetivo de verificar a participação do TRPA1 no efeito de redução de coceira dos doadores de H_2S , camundongos foram tratados com o agonista seletivo para esse receptor: AITC e com NaHS. O resultado apresentado na Figura 14 demonstra que o tratamento i.d. com NaHS (0.03-3 nmol/sítio) coinjectado juntamente com AITC (1000 nmol/sítio) não afetou a resposta pruriginosa evocada pelo agonista TRPA1 AITC.

Figura 14 - Efeito do NaSH sobre o comportamento de coçar induzido por AITC. Efeito do tratamento com NaSH (0.03-3 nmol/sítio), liberador rápido de H_2S , sobre o comportamento de coçar induzido por AITC (1000 nmol/sítio) ($n = 6$). Mostra-se a quantidade total ($\pm$ EPM) de acessos de coceira em 20 min depois da injeção intradérmica do estímulo pruriginoso.

4.8 Expressão proteica dos receptores PAR-2 e TRPA1 em pele de camundongos

4.8.1 Receptor PAR-2

Na avaliação da expressão proteica na pele do dorso de camundongos C57BL/6 por Western blot, detectaram-se duas bandas imunorreativas de pesos moleculares aproximados de 43 kDa e 55 kDa, compatíveis com os valores correspondentes ao PAR-2 informados na ficha técnica do anticorpo (Figura 15).

Figura 15 - Expressão proteica do receptor PAR-2 em pele de camundongos. Técnica de Western blot para detecção da expressão proteica do receptor PAR-2 em pele dorsal de camundongos C57BL/6 naive. As setas indicam bandas imunorreativas correspondentes a pesos moleculares aproximados de 43 e 55 kDa.

4.8.2 Receptor TRPA1

Como ilustra a Figura 16, o anticorpo policlonal anti-TRPA1 utilizado no ensaio de Western blot revelou a existência de uma banda de peso molecular aproximado de 127 kDa, correspondente ao peso molecular do TRPA1 presente nos homogenatos de pele de camundongos C57BL/6.

Figura 16 - Expressão proteica do receptor TRPA1 em pele de camundongos. A expressão do receptor na pele dorsal de camundongos C57BL/6 naive, foi avaliada por meio da técnica Western blot. A seta indica uma banda imunorreativa correspondente a um peso molecular aproximado de 127 kDa.

5 DISCUSSÃO

Em estudos prévios de nosso grupo foi reportado que o tratamento via intradérmica com doadores de H_2S reduz significativamente o prurido agudo induzido pela histamina em camundongos (Rodrigues, 2012). A histamina é o mediador de prurido agudo mais conhecido; em humanos e em animais de experimentação ela produz coceira intensa (Andrew, Craig, 2001; Kuraishi et al., 1995; Schmelz et al., 1997, 2002), a qual pode ser bloqueada pela administração de antagonistas dos receptores histaminérgicos tipo-1, conhecidos como anti-histamínicos (Twycross et al., 2003). No entanto, o mecanismo mediado por histamina não é a principal causa de prurido em condições sistêmicas e crônicas, tal como a dermatite atópica, resistentes ao tratamento com anti-histamínicos (Steinhoff et al., 2003; Twycross et al., 2003). Trabalhos mais recentes identificaram novos mediadores que induzem coceira, em grande parte, por vias independentes de histamina (Ikoma et al., 2006; Schmelz et al., 2003). Deste modo, resulta interessante examinar os efeitos dos doadores de H_2S nas condições de coceira induzidas por uma via independente da histamina.

Muitos estudos demonstraram a participação do PAR-2 como mediador do prurido não histaminérgico (Reddy et al., 2008; Shimada et al., 2006; Steinhoff et al., 2003; Tsujii et al., 2008; Ui et al., 2006). Pesquisas mostram que a administração de peptídeos agonistas do PAR-2 na pele, é capaz de produzir comportamento de coçar tanto em humanos (Steinhoff et al., 2003) quanto em animais de experimentação (Costa et al., 2010; Nakano et al., 2008; Shimada et al., 2006; Tsujii et al., 2008). Conforme com os dados encontrados na literatura, o presente trabalho demonstra que a injeção intradérmica do peptídeo SLIGRL-NH₂, agonista do PAR-2, na região dorsal do pescoço de camundongos, produz ataques de coceira, indicativos de um efeito pruriginoso. Ademais, o peptídeo SLIGRL-NH₂ foi capaz de causar um aumento do número de acessos coceira de maneira dependente da dose; resultados semelhantes foram descritos por Shimada et al. (2006) e Tsujii et al. (2008). Por outro lado, e em concordância com os dados mostrados na literatura (Akiyama et al., 2010a, 2014; Bell et al., 2004; Kuraishi et al., 1995), a administração i.d. da histamina no dorso de camundongos ocasionou um comportamento de coçar também de maneira dependente da dose. Entretanto, vale a pena notar que o SLIGRL-NH₂ é mais potente que a histamina, já que 300 nmol/sítio de histamina

foram necessários para induzir resposta similar à induzida por 40 nmol/sítio de SLIGRL-NH₂. O pré-tratamento intraperitoneal com pirilamina, um antagonista seletivo dos receptores H1 foi eficaz em inibir o comportamento de coçar induzido pela histamina, mas não o induzido pelo SLIGRL-NH₂. Estes resultados são semelhantes aos reportados por outros grupos usando os antagonistas seletivos dos receptores H1, pririlamina e terfenadina (Shimada et al., 2006; Tsujii et al., 2008), confirmando, assim, que o comportamento pruriginoso secundário à ativação do PAR-2 é independente de mecanismos histaminérgicos (Johanek et al., 2007; Reddy et al., 2008; Steinhoff et al., 2003; Tsujii et al., 2008).

Outras evidências experimentais mostram que o peptídeo SLIGRL-NH₂, é capaz de estimular o comportamento nociceptivo e hiperalgesia quando aplicado no tecido subcutâneo (Kawabata et al., 2001; Kawao et al., 2002; Vergnolle et al., 2001). Do mesmo modo, alguns pruritógenos como a histamina, podem induzir dor quando administrados em tecidos mais profundos (Hosogi et al., 2006; Johanek et al., 2008; Sikand et al., 2011b), o que evidencia a importância do procedimento de administração dos pruritógenos (Akiyama, Carstens, 2014). De fato, estudos de diferenciação entre comportamento pruriginoso e nociceptivo mostraram que a injeção intradérmica de pruritógenos como a histamina e agonistas PAR-2 provoca preferencialmente comportamento de coçar e pouco comportamento indicativo de dor (Akiyama et al., 2014; Shimada, LaMotte, 2008). Um aspecto interessante relatado na literatura é que a sensação de coceira surge a partir da camada superficial da pele, mas não a partir de tecidos mais profundos, a partir dos quais a dor pode ser sentida (Han et al., 2013).

Diante desses resultados, é possível concluir que o modelo experimental de indução do prurido pela administração i.d. do peptídeo SLIGRL-NH₂, agonista do PAR-2, pode ser utilizado para novos enfoques terapêuticos destinados a condições clínicas de prurido resistente ao tratamento com anti-histamínicos.

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi destacado recentemente como uma terceira molécula gasotransmissora endógena, caracterizada depois do óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (Wang, 2002). Foi reportado que o H₂S desempenha um papel importante em vários estados fisiológicos e patológicos; vários estudos propõem um potencial emprego de doadores de H₂S como antinociceptivo e anti-inflamatório (Distrutti et al., 2006a; Ekundi-Valentim et al., 2010; Mesquita, 2013; Sivarajah et al., 2009; Zanardo et al., 2006). Dados prévios de nosso grupo mostram

que os doadores de H_2S , Na_2S e reagente de Lawesson, inibem marcadamente o comportamento pruriginoso (e a inflamação cutânea relacionada) evocado por histamina e composto 48/80 na pele de camundongos (Rodrigues, 2012). Considerando os dados acima mencionados, foi testada a hipótese de o H_2S ser capaz de inibir o prurido de origem não-histaminérgico. Os resultados do presente estudo mostram que o tratamento concomitante com os doadores de H_2S , NaHS (liberador espontâneo) e GYY4137 (doador de liberação lenta) reduz significativamente a coceira induzida pela ativação do PAR-2 induzida pela aplicação i.d. do peptídeo SLIGRL- NH_2 (como demonstrado, uma via independente de histamina). Entretanto, observamos que o efeito do NaHS foi mais potente quando comparado ao GYY4137. A respeito da cinética de liberação de H_2S a partir dos doadores, a literatura reporta que o NaHS é usado como um equivalente de H_2S (ou das espécies que resultam do equilíbrio ácido-base em determinado pH), o que resulta em rápido aumento das concentrações de $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$ em meio aquoso (DeLeon et al., 2012). O doador GYY4137 libera H_2S por hidrólise, porém, a liberação de H_2S é muito mais lenta e sustentada, o que lhe confere uma ação prolongada (Li et al., 2008). No entanto, apesar do mecanismo de liberação lenta e sustentada de H_2S do GYY4137, inesperadamente no presente estudo, o pré-tratamento, 30 minutos antes, com GYY4137, não foi efetivo sobre o comportamento de coçar induzido pela ativação de PAR-2, sendo que o pré-tratamento com NaHS exibiu uma inibição semelhante ao observado no tratamento por coinjeção. Apesar da rápida depuração do sulfeto *in vivo* (por exemplo, na cavidade articular de ratos, a meia-vida biológica é de 22 min; Ekundi-Valentim et al., 2010), é possível especular que o H_2S no tecido ainda esteja em concentrações adequadas para exercer seus efeitos (mesmo 50 min após à sua administração) ou que tenha atingido as moléculas envolvidas na sinalização da coceira induzida por PAR-2, provavelmente por S-sulfidação de proteínas (Mustafa et al., 2009), um efeito mantido até o fim da análise do comportamento de coçar.

O estudo realizado por Lee et al. (2011) mostra em detalhe as cinéticas de geração de H_2S a partir de NaHS e GYY4137, sob condições fisiológicas, através de medições da concentração de H_2S em amostras de meio de cultura de células até 7 dias. O estudo mostra que a liberação de H_2S a partir de NaHS foi rápida alcançando o pico dentro dos primeiros 20 minutos e declinando a níveis indetectáveis em 90 minutos. Em contraste, a liberação de H_2S a partir de GYY4137

foi muito menor, porém constante, aumentando gradativamente e alcançando os níveis mais altos de concentração (<10% do observado com NaHS) depois de 2 horas, mantendo-se nestes níveis por mais de 7 dias. Além disso, Whiteman et al. (2015) fazendo uma análise crítica da cinética de liberação de H₂S a partir de GYY4137 declara que a produção de H₂S a partir deste doador é ineficiente necessitando a utilização de elevadas concentrações de doador. Tendo em consideração os reportes a respeito da cinética de liberação de H₂S a partir de GYY4137, e analisando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se deduzir que a ausência de efeito no pré-tratamento com este doador é consequência da produção ineficiente de H₂S no local injetado, devido à utilização de baixas concentrações do doador ou tempos curtos de pré-tratamento, sendo portanto necessárias concentrações mais elevadas ou períodos de tempo mais prolongados. No que concerne ao tratamento por coinjeção com GYY4137, é possível que a presença do efeito antipruriginoso esteja relacionada (pelo menos, parcialmente) com efeitos inespecíficos, atribuídos ao resto da molécula, pois em um período de 20 minutos seria pouco provável haver uma liberação suficiente de H₂S a partir de GYY4137 para produzir o efeito desejado. Para confirmar esta hipótese, experimentos deverão ser realizados com o composto ZYJ1122, análogo do GYY4137 porém desprovido de enxofre na sua estrutura química.

Por outro lado, efeitos pró-pruriceptivos do H₂S também foram reportados na literatura. O estudo de Wang et al. (2015) mostra que os doadores de H₂S, NaHS e Na₂S, podem induzir um comportamento de coçar intenso pela ativação de canais de cálcio tipo-T, de uma maneira dependente da dose, quando injetados por via i.d. no dorso de camundongos. NaHS e Na₂S começam a produzir coceira a partir da dose de 20 µg/sítio (~360 nmol/sítio de NaHS e ~250 nmol/sítio de Na₂S), sendo significante entre as doses de 100-800 µg/sítio. Estes dados aparentemente contraditórios podem ser explicados pela grande diferença de doses de doadores de H₂S administrados (neste estudo, os efeitos inibitórios sobre a coceira foram observados com doses aproximadamente 300 vezes menores de NaHS). Assim, é evidente que concentrações elevadas de H₂S no tecido poderiam induzir o comportamento de coçar, enquanto que em baixas concentrações, mediadores que preferencialmente antagonizam a resposta pruriginosa são alvos do H₂S.

Experimentalmente, o controle farmacológico do prurido está principalmente baseado em duas estratégias: a primeira é mediante o uso de antagonistas dos

receptores do prurido, tais como os anti-histamínicos; e a segunda estratégia é por meio do uso de drogas que bloqueiam as vias de sinalização ou transmissão do estímulo pruriginoso, como por exemplo, o antagonista μ -opióide naloxona (Greaves, 2010). Assim o H_2S estaria categorizado na segunda classe de drogas.

Com o objetivo de estudar os possíveis mecanismos através dos quais o H_2S exerce seu efeito antipruriginoso na coceira induzida pela ativação do PAR-2, foram investigados os canais de K_{ATP} , a via NO-GMPc e o receptor TRPA1.

Os canais de K_{ATP} são proteínas integrais de membrana que permitem o transporte seletivo de íons potássio ao extracelular. Estão compostos por quatro subunidades formadoras do poro tipo Kir6.2 e quatro subunidades do receptor de sulfoniluréia (SUR); a ligação do ATP a Kir6.2 conduz à inibição da atividade do canal (Craig et al., 2008). Assim, os canais de K_{ATP} estão abertos durante estados de baixa atividade metabólica, resultando em hiperpolarização da membrana, o que tem efeitos citoprotetores em tecidos vascular e neurais. Em situações de elevado metabolismo, a atividade do canal diminui e a despolarização da membrana resultante desencadeia diferentes respostas celulares (Akrouh et al., 2009).

O H_2S regula muitos processos biológicos por meio da ativação dos canais de K_{ATP} , sendo este o mecanismo molecular mais estudado desse mediador (Ali et al., 2007; Jiang et al., 2010; Spiller et al., 2010; Zhao et al., 2001). Por exemplo, a ação vasodilatadora do H_2S é antagonizada pela inibição dos canais de K_{ATP} com glibenclamida, um bloqueador específico dos canais de K_{ATP} , sugerindo que a ativação dos canais de K_{ATP} poderia estar envolvida no mecanismo de ação do H_2S (Zhao et al., 2001). Em estudos de nocicepção em ratos, Distrutti et al. (2006b) demonstraram que a administração sistêmica de NaHS inibe a nocicepção visceral, a qual foi revertida pela glibenclamida, mostrando que o efeito de H_2S é mediado pela abertura de canais de K_{ATP} . Do mesmo modo, Cunha et al. (2008) reportaram que o tratamento com H_2S inibiu a hipernocicepção mecânica induzida por PGE_2 em camundongos, e que tal efeito antinociceptivo é dependente de canais de K_{ATP} , uma vez que a inibição da hipernocicepção por NaHS foi impedida pela administração de glibenclamida. O H_2S ativa os canais de K_{ATP} pelo mecanismo de S-sulfidação, um processo que envolve a modificação covalente de grupos tiol (-SH) para hidropersulfetos (-SSH) de resíduos de cisteína (Cys6 e Cys26), localizados na alça extracelular do SUR (Jiang et al., 2010; Mustafa et al., 2009). Por outro lado, tem sido reportado na literatura, que a ativação do PAR-2 despolariza o potencial de

repouso da membrana através da inibição de correntes de potássio tipo M, em neurônios sensoriais (Linley et al., 2008; Kayssi et al., 2007). Tendo em consideração a informação reportada na literatura, no presente trabalho foi proposto que o efeito antipruriginoso do H_2S , no comportamento de coçar induzido pela ativação do receptor PAR-2, é dependente de canais de K_{ATP} . Apoiando esta proposta, a glibenclamida aboliu o efeito antipruriginoso do doador de H_2S , NaHS em camundongos; foi excluído qualquer efeito pró-pruriceptivo direto da glibenclamida nas doses efetivas em vista de que a administração i.d. promoveu comportamento pruriginoso diferente ao veículo, e não alterou a resposta induzida pelo SLIGRL-NH₂.

Por outro lado, a ação de H_2S poderia envolver interações com NO. NO é outra molécula endógena do grupo dos gasotransmissores, produzida a partir de L-arginina, NADPH e oxigênio molecular, catalisada pelas enzimas oxido nítrico sintases (NOS), dentre as que se contam as isoformas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (Calabrese et al., 2007). NO medeia uma série de eventos fisiológicos, tais como relaxamento do músculo liso, vasodilatação, neurotransmissão, inibição da agregação plaquetária e imunomodulação (Mujoo et al., 2011). Em nível celular regula o crescimento, sobrevivência, apoptose e diferenciação celular (Murad, 2006). A maioria dos efeitos mediados pelo NO são devidos à ativação da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), a qual catalisa a transformação de guanosina-5'-trifosfato (GTP) no segundo mensageiro guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), o que motiva que esta via seja chamada de NO-GMPc (Mujoo et al., 2011).

Publicações recentes indicam um papel regulatório de H_2S sobre o NO através de diferentes tipos de interações entre estes dois mediadores, tanto sinérgicas, quanto antagônicas: 1) interações funcionais, já que por exemplo, H_2S ou NO atuam relaxando os tecidos vasculares, no entanto, o efeito vasorrelaxante de NO, na aorta de rata, pode ser reduzido por H_2S (Zhao et al., 2001); 2) interações na produção endógena, por exemplo, foi reportado que H_2S induz a atividade de eNOS (King et al., 2014; Lei et al., 2010) em contraste, outros estudos revelam que H_2S inibe nNOS e eNOS (Kubo et al., 2007; Oh et al., 2006); e 3) interações diretas molécula-molécula, por exemplo, H_2S pode reagir com NO para formar compostos distintos como o nitrosotióis (RSNO), ácido tionitroso (HSNO) ou nitroxil (HNO; Filipovic et al., 2013; Whiteman et al., 2010). Um estudo demonstrou que enquanto o NaHS não

afeita na contratilidade de miócitos, este reverte os efeitos inotrópicos negativos induzidos pelo NO quando administrado simultaneamente; esta inibição foi atribuída à formação de HNO (Yong et al., 2010). Estes compostos derivados de NO não seriam capazes de estimular a produção de GMPc a menos que sejam decompostos por HgCl_2 ou CuCl_2 (Whiteman et al., 2006). Levando em consideração estas interações, neste estudo testamos este possível mecanismo de ação do H_2S na inibição da coceira. Assim, o tratamento concomitante de H_2S com nitroprusiato de sódio (SNP; doador não enzimático de NO) reverte parcialmente o efeito antipruriginoso do H_2S no comportamento de coçar induzido pela ativação de PAR-2. Por outro lado, a administração de ODQ (inibidor da enzima de GCs) não impede o efeito antipruriginoso do H_2S , mas ao contrario, parece potencializar tal efeito sem, porém, ser estatisticamente significativa. Futuros experimentos deverão ser realizados utilizando doses subefetivas de NaHS a fim de confirmar estas observações. Considerando estes resultados, pode-se sugerir que a inibição do NO, mas não da via GMPc, por uma interação entre H_2S e NO, é um possível mecanismo de ação para o efeito antipruriginoso do H_2S .

Estudos reportam que o NO esta envolvido na fisiopatologia de algumas doenças pruriginosas, tais como dermatite atópica e psoríase, tendo sido evidenciada expressão aumentada da iNOS assim como níveis elevados de produtos finais de degradação de NO no soro dos pacientes (Ormerod et al., 1998; Taniuchi et al., 2001). Também foi demonstrado que o NO tem um papel importante como mediador do comportamento de coçar evocado por algumas substâncias pruridogênicas. Andoh e Kuraishi (2003) relatam que o comportamento de coçar induzido por substancia P (SP) é reduzido pelo tratamento com um inibidor da NOS. Paralelamente, evidenciaram um incremento dos níveis de NO após injeção de SP na pele dos camundongos, e observaram que a SP induz a produção de NO em cultura de queratinócitos humanos. Por sua vez, Foroutan et al. (2015), demonstraram que em camundongos, a via NO-GMPc medeia, pelo menos em parte, o prurido induzido por cloroquina, um agonista do receptor acoplado a proteína G relacionado a Mas A3 (MrgprA3) e que a nNOS desempenha um papel importante nesta via. O trabalho recente de Ostadhadi et al. (2015) mostra que o comportamento de coçar induzido por serotonina é mediado pelo NO, cuja superprodução é secundária à indução de iNOS. Por outro lado, outros estudos demonstram que os efeitos pró-inflamatórios e vasodilatadores de PAR-2 são

mediados pela liberação de NO (Cenac et al., 2003; Chia et al., 2011; Seeliger et al., 2003; Sobey, Cocks, 1998). Baseados nestes estudos pode-se especular que NO poderia mediar, pelo menos em parte, o comportamento de coçar induzido pela ativação de PAR-2 e que o H₂S reduz este comportamento pela inibição de NO. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese na pele de camundongos.

Outro possível mediador das ações do H₂S estudado no presente trabalho foi o receptor de potencial transitório anquirina-1 (TRPA1). TRPA1 é um canal de cátions não seletivo que tem sido implicado em várias funções fisiológicas e sensoriais, incluindo a nocicepção, e sensação térmica, química e mecânica. São expressos principalmente nas fibras nervosas sensoriais do gânglio da raiz dorsal, bem como em alguns tecidos não neuronais, como celular epiteliais e folículos pilosos (Kwan et al., 2009; Story et al., 2003). Nas fibras C, encontram-se coexpressos os receptores TRPV1 e PAR-2, e a ativação destes receptores provoca a liberação de neuropeptídeos como a substância P e CGRP (Dai et al., 2007; Nassini et al., 2014; Story et al., 2003). O TRPA1 é ativado por compostos naturais irritantes como o alil-isotiocianato (AITC, óleo de mostarda), cinamaldeído (óleo de canela) e diversos poluentes industriais e irritantes ambientais (Calixto et al., 2005; Cavanaugh et al., 2008; Ferrandiz-Huertas et al., 2014). Além de substâncias químicas, a atividade dos receptores TRPA1 nas fibras nervosas sensoriais pode ser modulada por outros receptores, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (Ferrandiz-Huertas et al., 2014). O TRPA1 pode ser sensibilizado pela ativação dos receptores PAR-2 em neurônios do gânglio da raiz dorsal, envolvendo mecanismos mediados pela ativação da fosfolipase C (PLC) e fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), contribuindo à sensação de dor inflamatória (Dai et al., 2007).

Relatos da literatura mostram que a ativação do TRPA1 está diretamente relacionada com a cascata de ativação de receptores acoplados a proteína G, como os receptores MrgprA3 e MrgprC11 envolvidos na sinalização da coceira independente de histamina (Wilson et al., 2011). Neste estudo, a ativação neuronal mediada por cloroquina e BAM8-22 foi inibida pelo tratamento com o antagonista TRPA1, HC-030031. Outros estudos têm mostrado que TRPA1 também está relacionado com a coceira crônica produzida por alérgenos, interleucina 13 (IL-13), stress oxidativo e pele seca (Liu, Ji, 2012; Liu et al., 2013; Oh et al., 2013; Wilson et al., 2013a), já que em todos estes estudos mencionados o comportamento de coçar

foi reduzido pelo bloqueio dos receptores TRPA1 pelo tratamento com HC-030031. Por outro lado, Wilson et al. (2013b) indicaram que a ativação do PAR-2 pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ nos queratinócitos promove influxo de cálcio, o que induz transcrição e posterior liberação de TSLP. Por sua vez, esta citocina se liga a seu receptor expresso nos neurônios sensoriais para provocar coceira de forma dependente de TRPA1. Em conformidade com os relatos da literatura, os resultados do presente trabalho também revelam o envolvimento do TRPA1 no prurido induzido pela ativação do PAR-2, uma vez que o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ foi reduzido pelo bloqueio farmacológico dos receptores TRPA1 através do tratamento local com o antagonista seletivo HC-030031. Entretanto, e curiosamente, a coinjeção i.d. de doses subefetivas de SLIGRL-NH₂ e do agonista TRPA1 AITC não evidenciaram sinergismo entre os receptores, o qual deverá ser motivo de experimentos adicionais para a elucidação desta interação.

Trabalhos recentes destacam o H₂S como um modulador da atividade de TRPA1. De fato, foi evidenciado que o TRPA1 é ativado por elevadas concentrações de NaHS (1-10 mM) nas fibras nervosas sensoriais da bexiga urinária e células do gânglio da raiz dorsal, sugerindo que o H₂S gerado funcione como um agente pró-inflamatório e pró-nociceptivo via ativação de canais TRPA1 (Miyamoto et al., 2011; Ogawa et al., 2012; Streng et al., 2008). Além disso, o NaHS também induz incremento (de maneira dependente do tempo e da concentração) da concentração de cálcio intracelular em células CHO (Chinese hamster ovary) que expressam TRPA1 (Streng et al., 2008) e gânglio da raiz dorsal de camundongos (Ogawa et al., 2012). No entanto, os resultados do presente trabalho mostram que o comportamento de coçar induzido por AITC não foi afetado pelo tratamento com NaHS, o qual pode indicar que doses baixas do doador NaHS não exercem efeito sobre os receptores TRPA1.

Em soma, nossos dados mostram que os efeitos pruriginosos induzidos pela injeção do peptídeo SLIGRL-NH₂, agonista PAR-2, podem ser mediados por um mecanismo dependente do TRPA1, porém, o H₂S não interfere com esta via.

A expressão de PAR-2 e TRPA1 em pele de camundongos C57BL6 foi confirmada por Western blot, e as bandas imunorreativas mostraram pesos moleculares similares aos reportados na literatura (~55 kDa para PAR-2 e ~127 kDa para TRPA1). Numerosos estudos demonstram que tanto PAR-2 quanto TRPA1 estão amplamente expressos em queratinócitos, bem como, em neurônios aferentes

primários que inervam a pele (Akiyama et al., 2015; Amadesi et al., 2004; Böhm et al., 1996a; Dai et al., 2007; D'Andrea et al., 1998; Derian et al., 1997; Santulli et al., 1995; Steinhoff et al., 2000; Wilson et al., 2013b). Além disso, pacientes com dermatite atópica exibem um incremento da expressão de PAR-2 na pele. Futuros experimentos de imunohistoquímica deverão ser realizados a fim de determinar a localização destes receptores na pele dos nossos camundongos.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o comportamento de coçar induzido pela ativação do PAR-2 pelo peptídeo SLIGRL-NH₂ em camundongos, pode ser reduzido por doadores de H₂S, e este efeito está mediado pela abertura de canais de K_{ATP} e envolve NO mais não a via GMPc. Apesar do receptor TRPA1 mediar o prurido induzido por SLIGRL-NH₂, o H₂S não interfere com esta via.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados mostrados, podemos concluir que:

- A injeção intradérmica do peptídeo SLIGRL-NH₂, agonista do PAR-2, na região dorsal do pescoço de camundongos, produz ataques de coceira, indicativos de um efeito pruriginoso, de forma independente de histamina.
- A administração exógena de H₂S é capaz de reduzir o prurido induzido pela ativação de PAR-2, e este efeito está relacionado com o momento da administração, o tipo de doador e a dose administrada.
- O H₂S exerce seu efeito antipruriginoso no prurido secundário à ativação de PAR-2 é através da abertura dos canais de K_{ATP} e envolve NO, mas não a via GMPc.
- PAR-2 e TRPA1 são expressos constitutivamente na pele de camundongos e o receptor TRPA1 pode mediar o comportamento pruriginoso induzido pelo agonista PAR-2. Entretanto, o H₂S não interfere com a via do TRPA1.

REFERÊNCIAS*

- Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996;16(3):1066-71.
- Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther*. 2011;130(3):248-82.
- Akiyama T, Carstens E. Neural processing of itch. *Neuroscience*. 2013;250:697-714.
- Akiyama T, Carstens E. Spinal coding of itch and pain. In: Carstens EAT, editor. *Itch: mechanisms and treatment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014.
- Akiyama T, Carstens MI, Carstens E. Differential itch- and pain-related behavioral responses and μ -opoid modulation in mice. *Acta Derm Venereol*. 2010a;90(6):575-81.
- Akiyama T, Carstens MI, Carstens E. Enhanced scratching evoked by PAR-2 agonist and 5-HT but not histamine in a mouse model of chronic dry skin itch. *Pain*. 2010b;151(2):378-83.
- Akiyama T, Carstens MI, Carstens E. Facial injections of pruritogens and algogens excite partly overlapping populations of primary and second-order trigeminal neurons in mice. *J Neurophysiol*. 2010c;104(5):2442-50.
- Akiyama T, Carstens MI, Ikoma A, Cevikbas F, Steinhoff M, Carstens E. Mouse model of touch-evoked itch (alloknesis). *J Invest Dermatol*. 2012;132(7):1886-91.
- Akiyama T, Lerner EA, Carstens E. Protease-activated receptors and itch. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;226:219-35.
- Akiyama T, Merrill AW, Zanutto K, Carstens MI, Carstens E. Scratching behavior and Fos expression in superficial dorsal horn elicited by protease-activated receptor agonists and other itch mediators in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(3):945-951.
- Akiyama T, Nagamine M, Carstens MI, Carstens E. Behavioral model of itch, alloknesis, pain and allodynia in the lower hindlimb and correlative responses of lumbar dorsal horn neurons in the mouse. *Neuroscience*. 2014;266:38-46.
- Akiyama T, Tominaga M, Davoodi A, et al. Roles for substance P and gastrin-releasing peptide as neurotransmitters released by primary afferent pruriceptors. *J Neurophysiol*. 2013;109(3):742-8.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Akrouh A, Halcomb SE, Nichols CG, Sala-Rabanal M. Molecular biology of K(ATP) channels and implications for health and disease. *IUBMB Life*. 2009;61(10):971-8.

Al-Ani B, Saifeddine M, Hollenberg MD. Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH₂, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 1995;73(8):1203-7.

Ali MY, Whiteman M, Low CM, Moore PK. Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATP channel-dependent pathway. *J Endocrinol*. 2007;195(1):105-12.

Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res*. 2004;1000(1-2):40-56.

Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C- and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol*. 2006;575(Pt 2):555-71.

Amadesi S, Nie J, Vergnolle N, et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci*. 2004;24(18):4300-12.

Andoh T, Kuraishi Y. Nitric oxide enhances substance P-induced itch-associated responses in mice. *Br J Pharmacol*. 2003;138(1):202-8.

Andoh T, Nagasawa T, Satoh M, Kuraishi Y. Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK1 tachykinin receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(3):1140-5.

Andrew D, Craig AD. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci*. 2001;4(1):72-7.

Bautista DM, Wilson SR, Hoon MA. Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nat Neurosci*. 2014;17(2):175-82.

Beauchamp ROJ, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 1984;13(1):25-97.

Bell JK, McQueen DS, Rees JL. Involvement of histamine H₄ and H₁ receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice. *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):374-80.

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(8):1004-21.

Blanes M, Belinchón I, Portilla J, Betlloch I, Reus S, Sánchez-Payá J. Pruritus in HIV-infected patients in the era of combination antiretroviral therapy: a study of its prevalence and causes. *Int J STD AIDS*. 2012;23(4):255-7.

Böhm SK, Khitin LM, Grady EF, Aponte G, Payan DG, Bunnett NW. Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem.* 1996a;271(36):22003-16.

Bohm SK, Kong W, Bromme D, et al. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J.* 1996b;314(Pt 3):1009-16.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(10):766-75.

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 Ther.* 2005;106(2):179-208.

Carstens EE, Carstens MI, Simons CT, Jinks SL. Dorsal horn neurons expressing NK-1 receptors mediate scratching in rats. *Neuroreport.* 2010;21(4):303-8.

Cavanaugh EJ, Simkin D, Kim D. Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca²⁺ reveals different functional channel states. *Neuroscience.* 2008;154(4):1467-76.

Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, et al. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol.* 2003;170(8):4296-300.

Chen Y, Yang C, Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience.* 2011;193:440-51.

Chia E, Kagota S, Wijekoon EP, McGuire JJ. Protection of protease-activated receptor 2 mediated vasodilatation against angiotensin II-induced vascular dysfunction in mice. *BMC Pharmacol.* 2011;11:10.

Costa R, Manjavachi MN, Motta EM, et al. The role of kinin B1 and B2 receptors in the scratching behaviour induced by proteinase-activated receptor-2 agonists in mice. *Br J Pharmacol.* 2010;159(4):888-97.

Craig TJ, Ashcroft FM, Proks P. How ATP inhibits the open K(ATP) channel. *J Gen Physiol.* 2008;132(1):131-44.

Crilly A, Burns E, Nickdel MB, et al. PAR(2) expression in peripheral blood monocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):1049-54.

Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WAJ, et al. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *Eur J Pharmacol*. 2008;590(1-3):127-35.

Dai Y, Moriyama T, Higashi T, et al. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci*. 2004;24(18):4293-9.

Dai Y, Wang S, Tominaga M, et al. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1979-87.

Dalgard F, Svensson A, Holm JO, Sundby J. Self-reported skin morbidity in Oslo. Associations with sociodemographic factors among adults in a cross-sectional study. *Br J Dermatol*. 2004 ;151(2):452-7.

Dal-Secco D, Cunha TM, Freitas A, et al. Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels. *J Immunol*. 2008;181(6):4287-98.

D'Andrea MR, Derian CK, Leturcq D, et al. Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 1998 ;46(2):157-64.

Davidson S, Giesler GJ. The multiple pathways for itch and their interactions with pain. *Trends Neurosci*. 2010;33(12):550-8.

Davidson S, Zhang X, Khasabov SG, Simone, A D, Giesler GJJ. Relief of itch by scratching: state-dependent inhibition of primate spinothalamic tract neurons. *Nat Neurosci*. 2009;12(5):544–6.

Dawn A, Papoiu AD, Chan YH, Rapp SR, Rasette N, Yosipovitch G. Itch characteristics in atopic dermatitis: results of a web-based questionnaire. *Br J Dermatol*. 2009;160(3):642-4.

DeLeon ER, Stoy GF, Olson KR. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Anal Biochem*. 2012;421(1):203-7.

Derian CK, Eckardt AJ, Andrade-Gordon P. Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ*. 1997;8(7):743-9.

Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*. 1998;274(6 Pt 1):C1429-52.

Dhand A, Aminoff MJ. The neurology of itch. *Brain*. 2014;137(Pt 2):313-22.

Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, et al. 5-Amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of

mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. *Pharmacol Exp Ther.* 2006a;319(1):447-58.

Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, et al. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006b;316(1):325-35.

Dugas-Breit S, Schöpf P, Dugas M, Schiffli H, Ruëff F, Przybilla B. Baseline serum levels of mast cell tryptase are raised in hemodialysis patients and associated with severity of pruritus. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005;3(5):343-7.

Dunford PJ, Williams KN, Desai PJ, Karlsson L, McQueen D, Thurmond RL. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(1):176-83.

Ebert CSJ, McKinney KA, Urrutia G, et al. Expression of protease-activated receptors in allergic fungal rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014;4(4):266-71.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, et al. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. *Br J Pharmacol.* 2010;159(7):1463-74.

Feramisco JD, Berger TG, Steinhoff M. Innovative management of pruritus. *Dermatol Clin.* 2010;28(3):467-78.

Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf CJ, Devesa I, Ferrer-Montiel A. Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes (Basel).* 2014;4(3):525-64.

Filipovic MR, Eberhardt M, Prokopovic V, et al. Beyond H₂S and NO interplay: hydrogen sulfide and nitroprusside react directly to give nitroxyl (HNO). A new pharmacological source of HNO. *J Med Chem.* 2013;56(4):1499-508.

Foroutan A, Haddadi NS, Ostadhadi S, Sistany N, Dehpour AR. Chloroquine-induced scratching is mediated by NO/cGMP pathway in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015;134:79-84.

Gardell LR, Ma JN, Seitzberg JG, et al. Identification and characterization of novel small-molecule protease-activated receptor 2 agonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;327(3):799-808.

Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal.* 2013;11:86.

Grambow E, Mueller-Graf F, Delyagina E, Frank M, Kuhla A, Vollmar B. Effect of the hydrogen sulfide donor GYY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice. *Platelets.* 2014;25(3):166-74.

Grant AD, Cottrell GS, Amadesi S, et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J Physiol*. 2007;578(Pt 3):715-33.

Greaves MW. Pathogenesis and treatment of pruritus. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010;10(4):236-42.

Guenther F, Melzig MF. Protease-activated receptors and their biological role - focused on skin inflammation. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67(2):1623-33.

Guo W, Cheng ZY, Zhu YZ. Hydrogen sulfide and translational medicine. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(10):1284-91.

Hägermark O. Influence of antihistamines, sedatives, and aspirin on experimental itch. *Acta Derm Venereol*. 1973;53(5):363-8.

Han L, Dong X. Itch mechanisms and circuits. *Annu Rev Biophys*. 2014;43:331-55.

Han L, Ma C, Liu Q, et al. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat Neurosci*. 2013;16(2):174-82.

Han SK, Mancino V, Simon MI. Phospholipase C β 3 mediates the scratching response activated by the histamine H1 receptor on C-fiber nociceptive neurons. *Neuron*. 2006;52(4):691-703.

Handwerker HO. Microneurography of pruritus. *Neurosci Lett*. 2010;470(3):193-6.

Hosogi M, Schmelz M, Miyachi Y, Ikoma A. Bradykinin is a potent pruritogen in atopic dermatitis: A switch from pain to itch. *Pain*. 2006;126(1-3):16–23.

Ikoma A, Rukwied R, Ständer S, Steinhoff M, Miyachi Y, Schmelz M. Neurophysiology of pruritus: interaction of itch and pain. *Arch Dermatol*. 2003;139(11):1475-8.

Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S, Yosipovitch G, Schmelz M. The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(7):535-47.

Imamachi N, Park GH, Lee H, et al. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(27):11330-5.

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H₂S-induced activation of KATP channels. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:1167–78.

Johanek LM, Meyer RA, Friedman RM, et al. A role for polymodal C-fiber afferents in nonhistaminergic itch. *J Neurosci*. 2008;28(30):7659-69.

Johanek LM, Meyer RA, Hartke T, et al. Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch. *J Neurosci*. 2007;27(28):7490-7.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.

Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids*. 2004;26(3):243-54.

Kawabata A, Kawao N, Kuroda R, Tanaka A, Itoh H, Nishikawa H. Peripheral PAR-2 triggers thermal hyperalgesia and nociceptive responses in rats. *Neuroreport*. 2001;12(4):715-9.

Kawao N, Shimada C, Itoh H, Kuroda R, Kawabata A. Capsazepine inhibits thermal hyperalgesia but not nociception triggered by protease-activated receptor-2 in rats. *Jpn J Pharmacol*. 2002 ;89(2):184-7.

Kayssi A, Amadesi S, Bautista F, Bunnett NW, Vanner S. Mechanisms of protease-activated receptor 2-evoked hyperexcitability of nociceptive neurons innervating the mouse colon. *J Physiol*. 2007;580(Pt 3):977-91.

Kempkes C, Rattenholl A, Buddenkotte J, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 2 regulate invasive behavior of human melanoma cells via activation of protein kinase D1. *J Invest Dermatol*. 2012;132(2):375-84.

King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(8):3182-7.

Koga K, Chen T, Li XY, et al. Glutamate acts as a neurotransmitter for gastrin releasing peptide-sensitive and insensitive itch-related synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Mol Pain*. 2011;7:47.

Kolluru GK, Shen X, Bir SC, Kevil CG. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide*. 2013;35:5-20.

Kram L, Grambow E, Mueller-Graf F, Sorg H, Vollmar B. The anti-thrombotic effect of hydrogen sulfide is partly mediated by an upregulation of nitric oxide synthases. *Thromb Res*. 2013;132(2):e112-7.

Krueger G, Koo J, Lebwohl M, Menter A, Stern RS, Rolstad T. The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. *Arch Dermatol*. 2001;137(3):280-4.

Kubo S, Kurokawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A. Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology*. 2007;241(1-2):92-7.

Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesciogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol*. 1995;275(3):229-33.

Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci*. 2009;29(15):4808-19.

Lagerström MC, Rogoz K, Abrahamsen B, et al. VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch. *Neuron*. 2010;68(3):529-42.

Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, et al. The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *J Hypertens*. 2007;25(10):2100-4.

Lam DK, Dang D, Zhang J, Dolan JC, Schmidt BL. Novel animal models of acute and chronic cancer pain: a pivotal role for PAR2. *J Neurosci*. 2012;32(41):14178-83.

Lee ZW, Zhou J, Chen CS, et al. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2011;6(6):e21077.

Lei YP, Liu CT, Sheen LY, Chen HW, Lii CK. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide protect endothelial nitric oxide synthase against damage by oxidized low-density lipoprotein. *Mol Nutr Food Res*. 2010 ;54 Suppl 1:S42-52.

Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:169-87.

Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radic Biol Med*. 2009 ;47(1):103-13.

Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*. 2008;117(18):2351-60.

Linley JE, Rose K, Patil M, Robertson B, Akopian AN, Gamper N. Inhibition of M current in sensory neurons by exogenous proteases: a signaling pathway mediating inflammatory nociception. *J Neurosci*. 2008;28(44):11240-9.

Liu B, Escalera J, Balakrishna S, et al. TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. *FASEB J*. 2013;27(9):3549-63.

Liu Q, Weng HJ, Patel KN, et al. The distinct roles of two GPCRs, MrgprC11 and PAR2, in itch and hyperalgesia. *Sci Signal*. 2011;4(181):ra45.

Liu T, Ji RR. New insights into the mechanisms of itch: are pain and itch controlled by distinct mechanisms? *Pflugers Arch*. 2013;465(12):1671-85.

Liu T, Ji RR. Oxidative stress induces itch via activation of transient receptor potential subtype ankyrin 1 in mice. *Neurosci Bull*. 2012;28(2):145-54.

Liu Y, Abdel Samad O, Zhang L, et al. VGLUT2-dependent glutamate release from nociceptors is required to sense pain and suppress itch. *Neuron*. 2010;68(3):543-56.

Ma Q. Itch Modulation by VGLUT2-dependent glutamate release from somatic sensory neurons. In: Carstens E, Akiyama T, editor. *Itch: mechanisms and treatment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014.

Ma Q. Population coding of somatic sensations. *Neurosci Bull*. 2012;28(2):91-9.

Matterne U, Apfelbacher CJ, Loerbroks A, et al. Prevalence, correlates and characteristics of chronic pruritus: a population-based cross-sectional study. *Acta Derm Venereol*. 2011;91(6):674-9.

McCoy ES, Taylor-Blake B, Zylka MJ. CGRP α -expressing sensory neurons respond to stimuli that evoke sensations of pain and itch. *PLoS One*. 2012;7(5):e36355.

McMahon SB, Koltzenburg M. Itching for an explanation. *Trends Neurosci*. 1992;15(12):497-501.

Mesquita F. Avaliação farmacológica de compostos híbridos antiinflamatórios e analgésicos não esteróides doadores de sulfeto de hidrogênio na artrite e dor crônica. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; 2013.

Misery L, Rahhali N, Duhamel A, Taieb C. Epidemiology of pruritus in France. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(5):541-2.

Mishra SK, Hoon MA. The cells and circuitry for itch responses in mice. *Science*. 2013;340(6135):968-71.

Miyamoto R, Otsuguro K, Ito S. Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. *Neurosci Lett*. 2011;499(2):137-42.

Mujoo K, Krumenacker JS, Murad F. Nitric oxide-cyclic GMP signaling in stem cell differentiation. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(12):2150-7.

Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*. 2006;335(19):2003-11.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, et al. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*. 2009;2(96):ra72.

Nakano T, Andoh T, Tayama M, Kosaka M, Lee JB, Kuraishi Y. Effects of topical application of tacrolimus on acute itch-associated responses in mice. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(4):752-4.

Namer B, Carr R, Johanek LM, Schmelz M, Handwerker HO, Ringkamp M. Separate peripheral pathways for pruritus in man. *J Neurophysiol*. 2008;100(4):2062-9.

Nassini R, Materazzi S, Benemei S, Geppetti P. The TRPA1 Channel in Inflammatory and Neuropathic Pain and Migraine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2014;167:1-43.

Ogasawara Y, Isoda S, Tanabe S. Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. *Biol Pharm Bull*. 1994;12:171535-42.

Ogawa H, Takahashi K, Miura S, et al. H₂S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience*. 2012;218:335-43.

Oh GS, Pae HO, Lee BS, et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(1):106-19.

Oh MH, Oh SY, Lu J, et al. TRPA1-dependent pruritus in IL-13-induced chronic atopic dermatitis. *J Immunol*. 2013;191(11):5371-82.

Olas B. Hydrogen sulfide in hemostasis: friend or foe? *Chem Biol Interact*. 2014;217:49-56.

Ormerod AD, Weller R, Copeland P, et al. Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 1998;290(1-2):3-8.

Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(2):579-621.

Ostadhadi S, Haj-Mirzaian A, Azimi E, Mansouri P, Dehpour AR. Involvement of nitric oxide in serotonin-induced scratching in mice. *Clin Exp Dermatol*. 2015;40(6):647-52.

Patel KN, Dong X. An itch to be scratched. *Neuron*. 2010;68(3):334-9.

Patel KN, Dong X. Itch: Cells, Molecules, and Circuits. *ACS Chem Neurosci*. 2011;2(1):17-25.

Patel KN, Liu Q, Meeker S, Udem BJ, Dong X. Pirt, a TRPV1 modulator, is required for histamine-dependent and -independent itch. *PLoS One*. 2011;6(5):e20559.

Pisoni RL, Wikström B, Elder SJ, et al. Pruritus in haemodialysis patients: International results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(12):3495-505.

Reddy VB, Iuga AO, Shimada SG, LaMotte RH, Lerner EA. Cowhage-evoked itch is mediated by a novel cysteine protease: a ligand of protease-activated receptors. *J Neurosci*. 2008;28(17):4331-5.

Reddy VB, Lerner EA. Plant cysteine proteases that evoke itch activate protease-activated receptors. *Br J Dermatol*. 2010;163(3):532-5.

Ringkamp M, Schepers RJ, Shimada SG, et al. A role for nociceptive, myelinated nerve fibers in itch sensation. *J Neurosci*. 2011;31(42):14841-9.

Rishe E, Azarm A, Bergasa NV. Itch in primary biliary cirrhosis: a patients' perspective. *Acta Derm Venereol*. 2008;88(1):34-7.

Rodrigues L. Efeito de doadores de H₂S no controle do prurido e inflamação cutânea em camundongos. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*. 2010;401(12):318-20.

Roosterman D, Schmidlin F, Bunnett NW. Rab5a and rab11a mediate agonist-induced trafficking of protease-activated receptor 2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(5):C1319-1329.

Ross SE, Mardinly AR, McCord AE, et al. Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in Bhlhb5 mutant mice. *Neuron*. 2010;65(6):886-98.

Ross SE. Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2011;21(6):880-7.

Rothman S. Physiology of itching. *Physiological Reviews*. 1941;21:357-81.

Rothmeier AS, Ruf W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012 ;34(1):133-49.

Santulli RJ, Derian CK, Darrow AL, et al. Evidence for the presence of a protease-activated receptor distinct from the thrombin receptor in human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9151-5.

Savin JA. How should we define itching? *J Am Acad Dermatol*. 1998;39(2):268-9.

Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci*. 1997;17(20):8003-8.

Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjörk HE, Handwerker HO. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J Neurophysiol*. 2003;89(5):2441-8.

Schmelz M. Itch--mediators and mechanisms. *J Dermatol Sci*. 2002;28(2):91-6.

Schmidt R, Schmelz M, Weidner C, Handwerker HO, Torebjörk HE. Innervation territories of mechano-insensitive C nociceptors in human skin. *J Neurophysiol*. 2002;88(4):1859-66.

Seeliger S, Derian CK, Vergnolle N, et al. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *FASEB J*. 2003;17(13):1871-85.

Shelley WB, Arthur RP. Mucunain, the active pruritogenic proteinase of cowhage. *Science*. 1955;122(3167):469-70.

Shibuya N, Koike S, Tanaka M, et al. A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Commun*. 2013;4:1366.

Shim WS, Tak MH, Lee MH, et al. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *J Neurosci*. 2007;27(9):2331-7.

Shimada SG, LaMotte RH. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. *Pain*. 2008;139:681–7.

Shimada SG, Shimada KA, Collins JG. Scratching behavior in mice induced by the proteinase-activated receptor-2 agonist, SLIGRL-NH₂. *Eur J Pharmacol*. 2006;530(3):281-3.

Shive M, Linos E, Berger T, Wehner M, Chren MM. Itch as a patient-reported symptom in ambulatory care visits in the United States. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(4):550-6.

Shpacovitch V, Feld M, Bunnett NW, Steinhoff M. Protease-activated receptors: Novel PARtners in innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28(12):541–50.

Sikand P, Dong X, LaMotte RH. BAM8-22 peptide produces itch and nociceptive sensations in humans independent of histamine release. *J Neurosci*. 2011a;31(20):7563-7.

Sikand P, Shimada S, Green B, LaMotte R. Sensory responses to injection and punctate application of capsaicin and histamine to the skin. *Pain*. 2011b;152(11):2485–94.

Sikand P, Shimada SG, Green BG, LaMotte RH. Similar itch and nociceptive sensations evoked by punctate cutaneous application of capsaicin, histamine and cowhage. *Pain*. 2009;144(1-2):66-75.

Sivarajah A, Collino M, Yasin M, et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock*. 2009;31(3):267-74.

Sobey CG, Cocks TM. Activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2) elicits nitric oxide-dependent dilatation of the basilar artery in vivo. *Stroke*. 1998;29(7):1439-44.

Spiller F, Orrico MI, Nascimento DC, et al. Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K⁺ATP channel activation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(3):360-8.

Ständer S, Steinhoff M, Schmelz M, Weisshaar E, Metze D, Luger T. Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch. *Arch Dermatol.* 2003;139(11):1463-70.

Ständer S, Weisshaar E, Luger TA. Neurophysiological and neurochemical basis of modern pruritus treatment. *Exp Dermatol.* 2008;17:161-9.

Ständer S, Weisshaar E, Mettang T, et al. Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch. *Acta Derm Venereol.* 2007;87:291-4.

Steinhoff M, Bienenstock J, Schmelz M, Maurer M, Wei E, Bíró T. Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. *J Invest Dermatol.* 2006;126(8):1705-18.

Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, et al. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev.* 2005;26(1):1-43.

Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, et al. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci.* 2003;23(15):6176-80.

Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med.* 2000;6(2):151-8.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 2003;112(6):819-29.

Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, et al. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur Urol.* 2008;53(2):391-9.

Suen JY, Barry GD, Lohman RJ, et al. Modulating human proteinase activated receptor 2 with a novel antagonist (GB88) and agonist (GB110). *Br J Pharmacol.* 2012;165(5):1413-23.

Sun YG, Chen ZF. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature.* 2007;448(7154):700-3.

Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(11):917-35.

Taniuchi S, Kojima T, Hara Mt K, et al. Increased serum nitrate levels in infants with atopic dermatitis. *Allergy.* 2001;56(7):693-5.

Tsujii K, Andoh T, Lee JB, Kuraishi Y. Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and -independent pathways in mice. *J Pharmacol Sci.* 2008;108(3):385-8.

Tuckett RP, Wei JY. Response to an itch-producing substance in cat. II. Cutaneous receptor populations with unmyelinated axons. *Brain Res.* 1987;413(1):95-103.

Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, et al. Itch: scratching more than the surface. *Q J Med.* 2003;96:7-26.

Ui H, Andoh T, Lee JB, Nojima H, Kuraishi Y. Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. *Eur J Pharmacol.* 2006;530(1-2):172-8.

Vergnolle N, Bunnett NW, Sharkey KA, et al. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med.* 2001;7(7):821-6.

Von Frey M. Zur Physiologie der Juckempfindung. *Archives Neerlandaises de Physiologie de l'Homme et des Animaux.* 1922;7:142-5.

Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev.* 2012;92(2):791-896.

Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 2002;16(13):1792-8.

Wang XL, Tian B, Huang Y, et al. Hydrogen sulfide-induced itch requires activation of Cav3.2 T-type calcium channel in mice. *Sci Rep.* 2015;5:16768.

Weisshaar E, Dalgard F. Epidemiology of itch: adding to the burden of skin morbidity. *Acta Derm Venereol.* 2009;89(4):339-50.

Weisshaar E, Mattered U. Epidemiology of Itch. In: Carstens E, Akiyama T, editors. *Itch: mechanisms and treatment.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014.

Whiteman M, Li L, Kostetski I, et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;343(1):303-10.

Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:1147-54.

Whiteman M, Perry A, Zhou Z, et al. Phosphinodithioate and Phosphoramidodithioate Hydrogen Sulfide Donors. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;230:337-63.

Wilson SR, Gerhold KA, Bifulck-Fisher A, et al. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat Neurosci.* 2011;14(5):595-602.

Wilson SR, Nelson AM, Batia L, et al. The ion channel TRPA1 is required for chronic itch. *J Neurosci.* 2013a;33(22):9283-94.

Wilson SR, Thé L, Batia LM, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*. 2013b;155(2):285-95.

Wood GJ, Akiyama T, Carstens E, Oaklander AL, Yosipovitch G. An insatiable itch. *J Pain*. 2009;10(8):792-7.

Yan SK, Chang T, Wang H, Wu L, Wang R, Meng QH. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(2):485-91.

Yonezawa D, Sekiguchi F, Miyamoto M, et al. A protective role of hydrogen sulfide against oxidative stress in rat gastric mucosal epithelium. *Toxicology*. 2007;241(1-2):11-8.

Yong QC, Hu LF, Wang S, Huang D, Bian JS. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl. *Cardiovasc Res*. 2010;88:482-91.

Yosipovitch G, Ansari N, Goon A, Chan YH, Goh CL. Clinical characteristics of pruritus in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol*. 2002;147(1):32-6.

Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation. *Eur J Pharmacol*. 2007;559(1):65-8.

Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*. 2006;20(12):2118-20.

Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014a;5:67.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20(21):6008-16.

Zhao Y, Biggs TD, Xian M. Hydrogen sulfide (H₂S) releasing agents: chemistry and biological applications. *Chem Commun (Camb)*. 2014b;50(80):11788-805.

Zhao Y, Pacheco A, Xian M. Medicinal chemistry: insights into the development of novel H₂S donors. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;230:365-88.

Zheng Y, Ji X, Ji K, Wang B. Hydrogen sulfide prodrugs-a review. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):367-77.