LEANDRO RODRIGUES

**EFEITO DE DOADORES DO H₂S NO CONTROLE DO PRURIDO
E INFLAMAÇÃO CUTÂNEA 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
2012

LEANDRO RODRIGUES

**EFEITO DE DOADORES DO H₂S NO CONTROLE DO PRURIDO
E INFLAMAÇÃO CUTÂNEA 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

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa

Versão original

São Paulo
2012

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

Rodrigues, Leandro.

Efeito de doadores de H₂S no controle do prurido e inflamação cutânea em camundongos / Leandro Rodrigues. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Soraia Katia Pereira Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Inflamação

Versão do título para o inglês: Effect of H₂S donors in the control of pruritus and cutaneous inflammation in the mice.

1. Sulfeto de hidrogênio 2. Prurido 3. Inflamação 4. Histamina
5. Composto 48/80 6. camundongos I. Costa, Soraia Katia Pereira
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB031/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leandro Rodrigues.

Título da Dissertação: Efeito de doadores de H₂S no controle do prurido e
 inflamação cutânea em camundongos.

Orientador(a): Soraia Katia Pereira Costa.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil

Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **33** nas fls. **85** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Soraia Kátia Pereira Costa, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Avaliação farmacológica do sulfeto de hidrogênio endógeno e exógeno no aumento de permeabilidade de cutânea e prurido induzidos por histamina** do qual participou(aram) o(s) alunos **Leandro Rodrigues, Juliana Florenzano, Eduardo Ekundi Valentin e os pesquisadores Marcelo Nicolas Muscará**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **30.03.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 31 de março de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedico este trabalho

A minha amada esposa Kelli, por todo auxílio, incentivo, paciência e dedicação, fundamentais nos momentos mais difíceis. Amor com você tudo se torna mais fácil.

Aos meus queridos pais Laudelino e Maria Eulália, pelo grande apoio e incentivo, durante toda minha vida, sem os quais seria impossível ter realizado este estudo.

Aos queridos irmãos Rodrigues, Cibele, Anderson, Simone, Silvana, Débora e Jaqueline. Obrigado por todo apoio.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Profª Drª. Soraia Katia Pereira Costa, pela orientação e suporte deste estudo. Muito obrigado pelos conselhos e críticas, por seu envolvimento e dedicação durante todos os anos de realização deste projeto. Obrigado pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará pela co-orientação deste estudo, por todos os conselhos e críticas nos diversos momentos. Obrigado por seu apoio e amizade.

Agradeço à Dra. Simone Aparecida Teixeira pela amizade e fundamental auxílio na realização dos experimentos.

Aos amigos de laboratório, Aline Dantas, Paula Campi, Filipe Mesquita e Flavia Neto, obrigado pelo companheirismo.

Agradeço especialmente aos amigos Cristiane Silva, Rodrigo Porto e Karen Tiago. E ao grande amigo Marco Aurélio de Paula.

Meu obrigado especial aos grandes amigos que participaram diretamente na realização deste estudo, auxiliando nas técnicas *in vivo* e *in vitro*: Juliana Florenzano e Eduardo Ekundi-Valentim.

Agradeço às Sras. Irene Gouvea e Maria Alice Barreto pela valioso auxílio técnico na realização dos experimentos deste estudo.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

RESUMO

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

O prurido (coceira) é uma modalidade sensorial que, semelhantemente à dor, atua como mecanismo de proteção do organismo. Apesar dos avanços na terapia antipruriginosa, tais como os antagonistas de histamina, esses agentes são ineficazes em muitos pacientes, sugerindo que mecanismos alternativos estão envolvidos na condução do prurido. Recentemente, o novo mediador gasoso (H₂S) produzido endogenamente em mamíferos, vem se destacando pelas suas ações antiinflamatória e sensorial (anti-nocicepção). Todavia, seu papel no prurido ainda é desconhecido. Os objetivos deste estudo incluíram: 1) investigar o efeito de doadores de H₂S (Na₂S e reagente de Lawesson - LR) no prurido e inflamação cutânea frente à injeção intradérmica (i.d.) de histamina e composto 48/80 (C48/80) na pele dorsal de camundongos e, 2) avaliar a cinética de geração local (pele) do H₂S e a expressão das respectivas enzimas cystathionine-β-synthase (CBS) e cystathionine-γ-lyase (CSE) envolvidas na sua síntese. A injeção i.d. de histamina ou C48/80 induziu aumento significativo da frequência de coceira, além de promover potente extravasamento plasmático em relação ao veículo Tyrode. O C48/80 também promoveu aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) 4 h após a injeção, indicativo de influxo de leucócitos. O tratamento (coinjeção) na pele com o Na₂S (1 – 100 nmol/sítio) ou LR (3 – 300 nmol/sítio) reduziu (P<0,05) a inflamação cutânea evocado por histamina e C48/80, mas somente inibiu significativamente o prurido induzido por histamina. Os ensaios de *Western blot* e cinética de geração de H₂S revelaram, pela primeira vez, a expressão constitutiva das enzimas CSE e CBS e a geração local de H₂S na pele de camundongos BALB/c. A inflamação cutânea não afetou a expressão dessas enzimas. Conclui-se que as enzimas CBS e CSE estão expressas constitutivamente na pele, e que o aumento na biodisponibilidade do H₂S local, via emprego de doadores desse gás, exerce efeitos protetores, capazes de inibir a inflamação cutânea induzida por histamina e C48/80 e, ainda, reduzir o prurido frente à histamina. Sugere-se que doadores de H₂S representam um potencial terapêutico para o tratamento do prurido e inflamação cutânea.

Palavras-chave: Sulfeto de hidrogênio. Prurido. Extravasamento plasmático. Histamina. Composto 48/80. Camundongo.

ABSTRACT

Rodrigues L. Effect of H₂S donors in the control of pruritus and cutaneous inflammation in the mice. [Master thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.

Pruritus (itching) is a sensory modality that, similarly to pain, acts as a protective mechanism for the organism. Despite advances in anti-pruritic therapy with histamine antagonists occurred, these agents are sometimes ineffective in most patients, thus suggesting that alternative mechanisms are involved in the itching conduction. Recently, the new gaseous mediator (H₂S) endogenously produced in mammals, has been highlighted as an important modulator in the inflammatory and sensory (nociceptive) processes regulation, although its role in pruritus is still unknown. This study aimed: 1) to investigate the effect of H₂S donors (Na₂S and Lawesson's reagent - LR) in pruritus and cutaneous inflammation induced by histamine and compound 48/80 (C48/80) intradermally injected (i.d.) in the mice dorsal skin, 2) to evaluate the kinetics of H₂S generation and its enzymes expression cystathionine- β -synthase (CBS) and cystathionine- γ -lyase (CSE) in the naïve and inflamed skin, The i.d. injection of C48/80 or histamine induced an increased itching frequency, and lead to a potent plasma extravasation as compared to its vehicle (Tyrode). Additionally, C48/80 caused a marked increase in myeloperoxidase (MPO) activity 4 h after injection. Treatment (co-injection) of the skin with Na₂S (1–100 nmol/site) or LR (3–300 nmol/site) significantly reduced plasma extravasation and MPO activity evoked by C48/80 or histamine, but only ameliorated histamine-induced pruritus. Whereas Western blot analyzes revealed, for the first time, a constitutive expression of CSE and CBS in mouse naïve skin, the kinetic H₂S assay demonstrated a regular production of this gas in the naïve skin of BALB/c mice. We conclude that the increase in H₂S bioavailability in the skin, by the use of H₂S donors, exerts a protective effect against cutaneous inflammation and pruritus. Thus, H₂S donors may represent a potential alternative therapeutic class for the treatment of pruritus associated with cutaneous inflammation and pruritus.

Keywords: Hydrogen sulfide. Pruritus. Plasma extravasation. Histamine. Compound 48/80. Mice.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	- anti-inflamatório não esteroide
C48/80	- composto 48/80
CBS	- cistationina- β -sintase
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar
CGRP	- peptídeo vasodilatador relacionado ao gene da calcitonina
CHH	- O-carboximetil-hidroxilamina-hemihidratado
CMi _[hist+]	- fibra C mecanicamente insensível/sensível à histamina
CMi	- fibras C mecanicamente insensível
CSE	- cistationina- γ -lyase
COX-2	- ciclooxigenase 2
DAG	- diacilglicerol
FeCl ₃	- cloreto férrico
GRPR	- receptor do peptídeo liberador de gastrina
GPCR	- receptor acoplado à proteína G
IFSI	- fórum internacional para o estudo da coceira
H ₂ S	- sulfeto de hidrogênio
HCl	- ácido clorídrico
s.c	- subcutânea
i.d	- intradérmica
IL-1	- interleucina-1
IL-6	- interleucina-6
IP ₃	- inositol trifosfato
K _{ATP}	- canais de K ⁺ dependentes de ATP
LPS	- lipopolisacarídeo
LR	- reagente de Lawesson
MPO	- mieloperoxidase
NaCl	- cloreto de sódio
NaHS	- hidrosulfeto de sódio
Na ₂ S	- sulfeto de sódio
NF- κ B	- fator de transcrição nuclear kappa B
PARs	- receptores ativados por proteinases

PGE ₂	- prostaglandina E ₂
PGly	- DL-propargilglicina
PKC	- proteína C quinase
PLA ₂	- fosfolipase A ₂
PLCβ3	- fosfolipase Cβ3
PMSF	- fenil-metil-sulfonil-fluoridro
RNA _m	- ácido ribonucleico mensageiro
SP	- substância P
TBS-t	- tampão tris salina tween-20
TNF -α	- fator de necrose tumoral – alfa
TRIS	- tris (hidroximetil) aminometano
TRPV1	- receptor vaniloide de potencial transitório tipo 1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Classificação etiológica das diferentes categorias da coceira de acordo com a origem.....	15
Figura 1 – Ilustração esquemática das vias de condução para o prurido...	20
Figura 2 – Esquema ilustrando a teoria da seletividade	23
Figura 3 – Curva dose-efeito do Na ₂ S na coceira/prurido induzido pela injeção i.d. de histamina ou C48/80 na pele dorsal de camundongos	34
Figura 4 – Curva dose-efeito do LR na coceira/prurido induzido pela injeção i.d. de histamina ou C48/80 na pele dorsal de camundongos	36
Figura 5 – Curva dose-efeito do Na ₂ S e LR no extravasamento plasmático induzido pela injeção i.d. de histamina na pele dorsal de camundongos	38
Figura 6 – Curva dose-efeito do Na ₂ S e LR sobre o extravasamento plasmático induzido pela injeção i.d. de C48/80 na pele dorsal de camundongos	40
Figura 7 – Curva dose-efeito do Na ₂ S na atividade da enzima mieloperoxidase induzida pela injeção i.d. de C48/80 na pele dorsal de camundongos	42
Figura 8 – Curva dose-efeito do LR na atividade da enzima mieloperoxidase induzida pela injeção i.d. de C48/80 na pele dorsal de camundongos	43
Figura 9 – Cinética das atividades enzimáticas da CSE e CBS na pele dorsal naive de camundongos	45
Figura 10 – Análise da expressão protéica (Western blot) das enzimas CBS e CSE na pele naive dorsal de camundongos	47
Figura 11 – Efeito do tratamento com LR sobre a expressão protéica das enzimas CBS e CSE na pele de camundongos	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Estrutura e função da pele	13
1.2 Prurido e suas bases neurofisiológicas	14
1.3 Processamento do prurido no sistema nervoso central	21
1.4 H ₂ S e implicações na nocicepção	23
1.5 Justificativa do projeto	25
1.6 Objetivo e estratégias	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Animais	27
2.2 Indução do prurido (coceira) na pele dorsal de camundongos	27
2.3 Avaliação do extravasamento plasmático na pele dorsal de camundongos	28
2.4 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	29
2.5 Cinética da atividade enzimática da CSE e CBS na pele naïve de camundongos	29
2.6 Avaliação da expressão protéica, via Western Blot, das enzimas CSE e CBS na pele naïve e tratada de camundongos	30
2.7 Análise estatística	32
3 RESULTADOS	33
3.1 Estudos in vivo: avaliação da sensação de coceira e do extravasamento plasmático na pele dorsal de camundongos	33
3.1.1 Curva dose-efeito do sulfeto de sódio no prurido induzido por histamina e C48/80 na pele dorsal de camundongos	33
3.1.2 Curva dose-efeito do reagente de Lawesson no prurido induzido pela injeção i.d. de histamina e C48/80 na pele dorsal de camundongos	35
3.1.3 Curva dose-efeito dos doadores de H ₂ S no extravasamento plasmático produzido pela injeção i.d. de histamina na pele dorsal de camundongos	37
3.1.4 Curva dose-efeito dos doadores de H ₂ S no extravasamento plasmático produzido pela injeção i.d. de C48/80 na pele dorsal de camundongos	39
3.1.5 Curva dose-efeito dos doadores de H ₂ S no aumento de atividade da mieloperoxidase (MPO) induzido por C48/80 na pele dorsal camundongos	41
3.2 Estudo in vitro: avaliações de parâmetros bioquímicos	44
3.2.1 Cinética de atividade das enzimas geradoras de H ₂ S na pele naïve dorsal de camundongos	44
3.2.2 Expressão protéica (Western blot) das enzimas geradoras de H ₂ S na pele dorsal naïve e tratada de camundongos	46
4 DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e função da pele

A pele, além da proteção mecânica e sensorial oferecida ao organismo, atua como interface entre o corpo e o meio ambiente. Desta feita, alterações na homeostase de seu funcionamento desencadeiam prejuízos enormes para o organismo. Nesse contexto, as doenças dermatológicas, tais como urticária, eczema atópico, psoríase, mastocitose cutânea, dermatites entre outras, são exemplos de alterações que ocorrem na pele e afetam grandemente a qualidade de vida do ser humano. Isto porque o prurido (coceira) constitui um sintoma altamente desagradável e dominante nessas patologias de pele (Greaves e Wall, 1996; Pettigrew et al., 2010; Yshipovitch et al., 2003).

Considerada o maior e mais versátil órgão do corpo humano, a pele abrange uma área de até dois m² num indivíduo adulto. Possui mais de dois milhões de glândulas sudoríparas e cinco milhões de pelos, que cobrem diversas regiões do corpo, com exceção das palmas das mãos e região plantar dos pés. Constituída basicamente por um epitélio exterior escamoso estratificado, de origem ectodérmica (epiderme), e camada inferior mais espessa e vascularizada, de origem mesodérmica (derme), com espessura que varia entre 0,5–5 mm (Mcglone e Reilly, 2010; Stander et al., 2003).

Essa estrutura é densamente innervada por uma rede de fibras nervosas aferentes sensoriais especializados e eferentes autonômicos, que innervam as glândulas sebáceas, sudoríparas, vasos sanguíneos e folículos capilares. Os neurônios aferentes (ou sensoriais) representam a maior parte da inervação do tecido cutâneo e conduzem a informação da periferia (de receptores ou órgãos do sentido) até o sistema nervoso central (SNC). Portanto, são responsáveis por transmitir diversos estímulos (Boulais e Misery, 2008).

A classificação das fibras sensoriais, feita com base no grau de mielinização axonal que determina a velocidade de condução dos impulsos nervosos, inclui as fibras do tipo A e C. As fibras nervosas do tipo A subdividem-se em α , β e δ . O subtipo A α são fibras de grande diâmetro (20 μ m) e axônios mielinizados, que desempenham alta velocidade de condução (120 m/s), tais como os neurônios musculares proprioceptivos. As fibras A β

participam do tato discriminativo e contêm axônios mielinizados com diâmetro intermediário/médio (10 μm) e alta velocidade de condução (80 m/s). Além disso, possuem baixo limiar de ativação. As fibras A δ , cujo axônio mielinizado possui menor diâmetro (2,5 μm), apresentam baixa velocidade de condução (12 m/s) e participam, principalmente, da transmissão de estímulos nociceptivos e térmicos. Em contrapartida, as fibras sensoriais do tipo C possuem axônios amielínicos, de pequeno diâmetro (1 μm), e baixa velocidade de condução (< 1 m/s). Tais fibras estão envolvidas na transmissão de estímulos tátil (grosseiro), nociceptivo (sensação dolorosa) e das sensações de cócegas e prurido (Julius e Basbaum, 2001; Mcglone e Reilly, 2010).

1.2 Prurido e suas bases neurofisiológicas

Há mais de 350 anos, o médico alemão Samuel Hafenreffer (1660) definiu o prurido como “uma sensação desagradável com origem na pele, que leva o indivíduo ao desejo ou reflexo de coçar-se” (Wahlgren, 1995). Devido à ampla variação de significado do termo *desagradável* contido na definição original da coceira, Savin, 1998 a re-definiu como “uma sensação que, se suficiente forte, irá provocar reflexo ou desejo para coçar-se”.

Mais recentemente, o Fórum Internacional para o estudo da coceira (International Forum for the Study of Itch – IFSI) estabeleceu que o sinal de coceira superior a seis semanas de duração, classifica a coceira como uma condição crônica (Ständer et al., 2007). A coceira crônica torna-se incômoda e debilitante, afetando profundamente a qualidade de vida de seus portadores (Yosipovitch et al., 2003). Todavia, vale ressaltar que o prurido *per se* não é uma doença, mas sim um dos principais sintomas de doenças de pele e de algumas doenças sistêmicas e neurológicas (Ständer et al., 2008; Wallengren, 2005) e, por conta disso, de difícil classificação.

Postula-se que a classificação neurofisiológica da coceira, baseada no seu local de origem, determina que esta poderá ser de origem periférica (dérmica ou neuropática) ou central (neuropática, neurogênica ou psicogênica) (Twycross et al., 2003). Enquanto a coceira de origem dérmica resulta da estimulação das terminações nervosas cutâneas por um ou vários agentes pruritogênicos, a coceira do tipo neuropática decorre de uma lesão na região

periférica ou central da via aferente pruriceptiva. A coceira de origem neurogênica associa-se, em geral, a algum fenômeno que eleva a concentração de opioides e, conseqüentemente, aumenta o tônus opioidérgico. Já a coceira de origem psicogênica, associa-se aos distúrbios psiquiátricos ou fatores psicológicos.

Buscando estabelecer critérios clínicos para a classificação da coceira, membros da IFSI (Ständer et al., 2007) subdividiram em três categorias os pacientes acometidos por tal sintoma: I – prurido associado às doenças de pele, com lesões primárias decorrentes de alterações causadas pela própria doença, II – prurido em pacientes com a pele normal, mas com doenças sistêmicas, neurológicas ou psicossomáticas e, III – prurido crônico, com lesões secundárias na pele, adquiridas pelo ato de coçar-se frequentemente por longos períodos (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação etiológica das diferentes categorias da coceira de acordo com a origem.

CATEGORIA	DOENÇAS
I – Dermatológica (grupo I e III)	da pele (psoríase, dermatite atópica, urticária)
II – Sistêmica (grupo II e III)	com origem em outros órgãos, como o fígado (cirrose biliar primária) e rim (insuficiência renal crônica)
III – Neurológica (grupo II e III)	oriundas no SNC e periférico (lesão, compressão nervos)
IV – Psicogênica / Psicossomática (grupo II e III)	origem somatoforme com co-morbidade de doenças psicogênicas e psicossomáticas
V – Mistas	sobreposição e coexistência de várias doenças
VI – Outras	origem indeterminada

FONTE: Adaptada de Ständer et al. (2007)

Paralelamente, teorias de codificação neural e hipóteses foram também estabelecidas para tentar explicar o mecanismo de sinalização da coceira. Dentre elas, estão as teorias da intensidade e da especificidade.

A teoria da intensidade sugere que a mesma população de neurônios nociceptivos (nociceptores) sinaliza tanto para a coceira quanto para dor. A

distinção entre ambos os fenômenos baseia-se na frequência e intensidade da estimulação nervosa (von Frey, 1922). Ou seja, na vigência da ativação de baixa intensidade dos neurônios, experimenta-se a sensação de coceira, enquanto a ativação de alta intensidade destes resulta na sensação de dor.

Em contraste, a teoria da especificidade determina que estímulos que desencadeiam as sensações de coceira e dor, gerados na periferia, são transmitidos por vias aferentes distintas. Por seu turno, sugere-se que, em geral, a aplicação de baixas concentrações de substâncias algogênicas não produz a sensação de coceira, mas sim, a sensação dolorosa de baixa intensidade (Bíró et al., 2007). Tais achados não corroboram a teoria da intensidade e, ao contrário, sugerem que mudanças na frequência de ativação da mesma população de fibras nervosas não são capazes de transmitir os fenômenos de dor e coceira.

Em 1997, Schmelz et al. (1997) forneceram as primeiras evidências sobre a existência de um subtipo de fibras aferentes do tipo C, específicas para condução do prurido. Estas se mostraram sensíveis à estimulação por histamina, mas insensíveis à estimulação mecânica. A partir desse conhecimento, as fibras C foram subclassificadas como mecanicamente insensíveis e sensíveis à histamina (fibras CMi_[hist+]). Cabe ressaltar que o tipo mais comum de fibras C, conhecidas como nociceptores mecânicos e termossensíveis (polimodais), ao contrário das fibras CMi_[hist+], respondem de forma reduzida à histamina.

Os diferentes tipos de fibras C distribuem-se de forma pouco uniforme na periferia, onde se observa a predominância, aproximadamente 80%, de nociceptores polimodais (Schmidt et al., 1997). Os 20% restantes, correspondem, na sua maioria, aos nociceptores mecanicamente insensíveis (fibras CMi). As fibras CMi_[hist+] representam um sub-grupo de fibras CMi, correspondendo, aproximadamente, a 20% do total destas fibras (Steinhoff et al., 2006).

Na inervação da pele, as fibras CMi_[hist+] correspondem à 4 % das fibras C totais e destacam-se por sua velocidade de condução, que é extremamente lenta. Os nociceptores Cmi (fibras Cmi) são ativados por estímulos químicos; contudo, podem tornar-se responsivos à estimulação mecânica quando em

estado sensibilizado. Por conta disso, são também denominados nociceptores silenciosos ou adormecidos (Schmelz et al., 2000a).

O conhecimento de uma via específica para a condução de estímulos que desencadeiam a sensação de coceira, exclusivamente por fibras CMI_[hist+], adquiriu maior aceitação após estudos de Andrew e Craig, (2001), os quais observaram uma população de neurônios do trato espinotalâmico (neurônios secundários insensíveis à estimulação mecânica e com baixa velocidade de condução) no corno dorsal da medula espinal. Esses neurônios são sensíveis à aplicação periférica de histamina e projetam-se centralmente para regiões do tálamo, distintas dos neurônios de projeção para a dor, reforçando assim a teoria da especificidade.

Como é de conhecimento, no local da aplicação intradérmica da histamina, observa-se a formação do eritema reflexo-axônico, caracterizado por vasodilatação neurogênica, induzida pela liberação de neuropeptídeos, tais como a substância P (SP) e o peptídeo vasodilatador relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) das fibras CMI_[hist+] (Schmelz et al., 2000b). Ademais, a utilização de histamina em diversos estudos para o entendimento do prurido, fez com que este mediador se tornasse um dos agentes pruritogênicos mais estudados (Ikoma et al., 2006; Jeffry et al., 2011).

Os efeitos da histamina ocorrem via ativação de receptores de histamina (H) acoplados à proteína G (GPCR). Até o momento, pelo menos quatro subtipos de receptores foram identificados, denominados H₁, H₂, H₃ e H₄ (Hill et al., 1997; Oda et al., 2000). Salienta-se que os subtipos H₁ e H₄ são os principais receptores envolvidos na sensação de prurido (Bell et al., 2004; Rossbach et al., 2011; Suwa et al., 2011).

Em humanos, a histamina é principalmente armazenada em grânulos intracelulares de mastócitos, juntamente com proteases e heparina de alto peso molecular, em quantidades que variam de 1 a 4 pg por célula (Church & Levi-Schaffer, 1997). Diversos modelos experimentais já avaliaram a liberação dos componentes granulares armazenados em mastócitos, via utilização da ferramenta farmacológica denominada composto 48/80 (C48/80).

O C48/80 é um produto da condensação do N-metil-p-metoxifenetilamina com formaldeído, que resulta na formação de polímeros de baixo peso molecular, normalmente com grau de polimerização entre 3 e 6 unidades

poliméricas. Esse composto possui a propriedade de causar a desgranulação de mastócitos (de Vasconcelos et al., 2011; Kim et al., 1999; Ohta et al., 2002; Sugimoto et al., 1998; Suh et al., 2011) via ativação direta dos subtipos de proteína G (subtipo G_{i2} e G_{i3}). Isto culmina na ativação do mecanismo intracelular, que é dependente da estimulação da enzima PLC ($PLC\beta$), que leva ao aumento de cálcio e a consequente exocitose dos conteúdos granulares dessas células (Ferry et al., 2002).

Pela grande capacidade do C48/80 causar prurido, muitos trabalhos investigam os mecanismos de sinalização dependente da liberação subsequente de histamina nesse fenômeno. Nesse sentido, Shim et al. (2007), em estudo para avaliar a relação entre histamina e TRPV1 (receptor da capsaicina), observaram que o influxo de correntes induzido por histamina em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos ICR foi reduzido na presença da capsazepina, um antagonista dos receptores TRPV1. Além disso, quando o cDNA do subtipo de receptor H_1 da histamina e do TRPV1 de ratos foi co-transfectado para células HEK 293T (células embrionárias de rim humano) em cultura, observou-se maior influxo de correntes após estimulação por histamina. Tal efeito foi reduzido pelo tratamento com a capsazepina ou pirilamina (antagonista seletivo do receptor H_1) ou, ainda, abolido quando o cDNA do receptor H_1 de histamina ou TRPV1 foi transfectado isoladamente nessa cultura de células. Em estudos *in vivo*, os mesmo autores verificaram que pré-tratamento de camundongos com capsazepina reduziu o número de ataques de coceira induzidos pela injeção i.d. de histamina. Semelhantemente, camundongos nocautes para os receptores TRPV1 apresentaram redução no número de ataques de coceira após a injeção i.d. de histamina quando comparado aos animais selvagens.

Alguns mecanismos de sinalização intracelular foram sugeridos para tentar explicar a relação entre os receptores TRPV1 e H no prurido (Figura 1). Por exemplo, a utilização de um inibidor de PLC (U73122) em cultura celular de neurônios sensoriais de ratos bloqueou o influxo de íons Ca^{2+} induzido por histamina (Nicolson et al., 2002). Além disso, Han et al. (2006) observaram que a ativação do receptor H_1 por histamina em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal resultou na ativação da $PLC\beta3$ e consequente aumento na concentração intracelular de íons Ca^{2+} . Em contrapartida, nos camundongos

nocautes para PLC β 3, o número de ataques de coceira após a injeção i.d. de histamina foi significativamente menor em relação ao grupo selvagem.

Sabe-se que, por ação da enzima PLC, dois mensageiros intracelulares são gerados, incluindo o inositol trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). Cabe ressaltar que o ensaio de *PatchClamp* em células HEK 293T transfectadas com cDNA do TRPV1 mostrou que a administração do análogo do DAG, 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG), aumentou o influxo de correntes de Ca²⁺ nessa preparação (Woo et al., 2008). Esse aumento foi abolido quando a preparação recebeu capsazepina. Ainda, o aumento de correntes de Ca²⁺ não ocorreu em cultura de células HEK 293T não transfectada com os TRPV1 (Woo et al., 2008). Ademais, estudos conduzidos por Kim et al. (2004) demonstraram que o aumento da concentração de íons Ca²⁺ induzido por histamina em neurônios do corno da raiz dorsal em cultura, foi abolido por quinacrina, um inibidor da PLA₂. Isto sugere um mecanismo alternativo de ativação da cascata de sinalização intracelular dos receptores H na ativação de neurônios sensoriais.

A estimulação elétrica de baixa intensidade e alta frequência evoca coceira em humanos, embora não promova a formação do eritema resultante do reflexo-axônico, efeito esse característico da ativação das fibras CMI_[hist+]. Isto sugere que outras fibras periféricas participam da condução do estímulo para induzir ao prurido (Ikoma et al., 2005). De fato, segundo estudo realizado em macacos, duas populações de neurônios responsáveis pelo processamento da coceira foram identificadas no trato espinotalâmico. Uma população mostrou-se responsiva à estimulação por histamina, enquanto a outra pelo princípio ativo mucanaina, uma cisteína protease presente nos tricomas da leguminosa *Mucuna pruriens*, típica de regiões tropicais (Davidson et al., 2007). Curiosamente, a coceira gerada por aplicação tópica da mucanaina não está associada à formação de eritema, efeito característico do reflexo-axônico gerado pela ativação das fibras CMI_[hist+] na pele de humanos (Johanek et al., 2007). Além disso, registros dos potenciais de ação das fibras C no nível do nervo fibular (presente na perna próximo à fíbula) em humanos, demonstraram que a mucanaina ativa nociceptores polimodais, porém não estimula nenhuma fibra do tipo Cmi. Tal resposta, inversa ao que a histamina foi capaz de causar, indica que os nociceptores polimodais são, portanto, responsáveis pela

transmissão da sensação de coceira induzida por mucanina (Figura 1; Namer et al., 2008).

Figura 1 – Ilustração esquemática das vias de condução para o prurido.

(a) fibras C polimodais ativadas por estímulos não histaminérgicos, mucanina liberada de tricomas (cowhage), ativa PAR₂ no terminal sensorial. (b) ativação das fibras CMi_[hist+] por histamina e outros mediadores como bradicinina (agindo sob receptores B1 e B2) e cloroquina (sob o receptor MrgprA3), esta ativação leva a liberação de mediadores pró-inflamatórios como SP e CGRP. (c) fibras aferentes polimodais C e CMi_[hist+], estabelecem sinapses no corno da raiz dorsal na medula com neurônios de projeção, ascendendo para o tálamo.

FONTE: Davidson e Giesler, 2010.

Ademais, evidências mostram que o prurido evocado pelo contato da mucanina com a pele humana e outros animais envolve a ativação de receptores ativados por proteinases (PARs) do tipo 2 e 4 (PAR₂ e PAR₄; Reddy et al., 2008), os quais, curiosamente, estão também envolvidos no prurido de pacientes acometidos por dermatite atópica. Esses pacientes apresentam alta concentração de triptase (proteinase agonista do receptor PAR₂) e alta expressão protéica dos PAR₂ nas fibras nervosas aferentes em comparação aos indivíduos não acometidos por essa doença (Steinhoff et al., 2003). Reforçando tais achados, a administração i.d. de triptase em camundongos ICR produziu ataques de coceira, os quais foram inibidos por FSLLRY-NH₂, um antagonista de receptores PAR₂ (Ui et al., 2006). Segundo Tsujii et al. (2008), os receptores PAR₁ e PAR₄ estão envolvidos na indução do prurido por um

mecanismo que, em parte, é dependente da liberação de histamina de mastócitos da pele, pois o anti-histamínico H_1 , terfenadina, diminuiu o prurido induzido por agonistas seletivos dos receptores PAR_1 e PAR_4 . Todavia, o envolvimento da histamina no prurido relacionado aos receptores PAR_2 foi descartado, visto que a terfenadina não inibiu o prurido evocado por agonistas específicos dos receptores PAR_2 , sugerindo que o prurido resultante da ativação dos receptores PAR_2 depende da ativação direta das fibras sensoriais.

1.3 Processamento do prurido no sistema nervoso central

Há ainda extensa discussão sobre as vias e áreas cerebrais envolvidas no processamento da coceira, bem como de vias responsáveis pela condução dessa informação, a partir da periferia. Em geral, muitos dos aferentes primários realizam as sinapses no gânglio da raiz dorsal transmitindo a informação para a medula espinal.

Salienta-se que as fibras condutoras da coceira, oriundas da lamina I do corno da raiz dorsal, projetam-se para a parte posterior dos núcleos ventromedial do tálamo e daí, projetam-se para o córtex insular dorsal (Steinhoff et al., 2006). Em humanos, experimentos utilizando tomografia por emissão de pósitrons, a qual avalia o fluxo sanguíneo e a atividade em diferentes áreas do cérebro, mostrou que a coceira na pele após administração de histamina nos pacientes, aumenta paralelamente o fluxo sanguíneo nas áreas do córtex cingulado anterior, córtex parietal, córtex pré-frontal dorsolateral e córtex pré-motor (Mochizuki et al., 2003). Outros achados demonstraram que após um estímulo pruritogênico, a ativação de áreas envolvidas com o processamento motor corresponde ao desejo de coçar-se durante episódios ou ataques de coceira (Ikoma et al., 2006). Ademais, quando estímulos que levam à dor e prurido são aplicados simultaneamente, acarretam a ativação da substância cinzenta periaquedutal que, por sua vez, exercem efeitos inibitórios sobre a atividade de áreas do cérebro, como o córtex cingulado, dependentes de mediadores pruritogênicos aplicados na periferia. Tais achados reforçam a participação da substância cinzenta periaquedutal na modulação central da coceira pela dor, indicando que a sensação de prurido,

em comum com a dor, depende de interação do sistema nervoso central (Drzezga et al., 2001).

Utilizando-se técnicas específicas para induzir morte celular de neurônios da lamina I no corno dorsal da medula, que expressam receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR), Sun et al. (2007, 2009) observaram redução nos ataques de coceira induzidos por agentes pruritogênicos (histamina, C48/80, serotonina, endotelina 1 e agonista PAR₂) em camundongos. Isto indica que os GRPR exercem papel importante no prurido, reforçando assim a teoria da especificidade.

Outra hipótese interessante para explicar a sinalização periférica do prurido, somada à descoberta dos neurônios de projeção GRPR⁺, inclui a *teoria da seletividade*. Esta propõe que a população de neurônios aferentes nociceptivos relacionados à dor, exerce efeito inibitório sobre os neurônios de projeção para coceira, muito embora os neurônios de projeção possam ser ativados por fibras CMi_[hist+], fibras CMi ou nociceptores polimodais (Handwerker, 2010). Assim, numa condição em que as fibras aferentes primárias ativam simultaneamente as populações de neurônios de projeção relacionados à coceira e dor, a sensação de coceira é suprimida pela sensação de dor. Esse conceito pode ser aplicado para explicar a ausência da percepção simultânea das sensações de prurido e dor. Ainda, explica porque a dor evocada por arranhões ao coçar-se ou por estímulos nociceptivos (térmico, físico ou químico) acaba reduzindo a sensação de coceira (Ward et al., 1996).

A inibição da sensação de coceira pode ocorrer na medula espinal por ação de uma classe de interneurônios inibitórios, os quais são ativados por vias ascendentes nociceptivas. Outra classe de interneurônios inibitórios, ao ser ativado por opioides, pode exercer o efeito inverso e inibir os neurônios de projeção da via nociceptiva (Figura 2). Esses interneurônios quando ativados induzem a sensação de prurido, efeito colateral comum da administração de opioides (Handwerker, 2010).

Figura 2 – Esquema ilustrando a teoria da seletividade.

Neurônios de projeção para coceira recebem aferências das fibras CMI_{hist+}, fibras CMI ou nociceptores polimodais (CMH). Neurônios de projeção para dor recebem aferências das fibras CMI ou nociceptores polimodais. Interneurônios "Itch in" são ativados pelos neurônios de projeção para dor e estabelecem sinapses inibitórias sob o neurônio de projeção para coceira, interneurônios "opioid in" inibem neurônios de projeção para dor e interneurônios "Itch in"

FONTE: Handwerker (2010)

1.4 H₂S e implicações na nocicepção

O gás H₂S, um conhecido poluente ambiental, recentemente vem sendo considerado, juntamente com o óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO), um membro da crescente classe de mediadores gasosos (gasotransmissores) ao qual desempenha funções importantes na manutenção da homeostasia dos sistemas biológicos, incluindo a regulação da homeostase vascular e função do sistema nervoso central. Ademais, o H₂S vem sendo considerado um importante modulador em estados inflamatórios e nociceptivos (Pae et al., 2009).

Em humanos e em outras espécies animais, o H₂S é sintetizado endogenamente a partir do aminoácido L-cisteína, por ação das enzimas cistationina-γ-liase (CSE) e cistationina-β-sintase (CBS) (Stipanuk e Beck, 1982). Tais enzimas estão amplamente distribuídas no organismo humano, sendo que concentrações elevadas da CBS foram encontradas em órgãos

como cérebro, enquanto a CSE encontra-se, principalmente, no fígado e rim (Zhao et al., 2001).

Nos processos inflamatório e doloroso, o envolvimento do H_2S ainda é bastante controverso, visto que alguns estudos demonstram papel antiinflamatório e anti-nociceptivo para esse gás (Chen et al., 2009; Zanardo et al., 2006), enquanto outros sugerem efeito pró-inflamatório e algésico (Bathia et al., 2005a; Zhang et al., 2006).

No que tange ao processo nociceptivo, estudo recente do nosso grupo mostrou que tanto a alodinia secundária quanto a inflamação articular observada no modelo de sinovite induzida por carragenina em joelho de ratos foi marcadamente reduzida pelo tratamento local dos animais com o reagente de Lawesson (LR), um doador exógeno de H_2S , reforçando o papel anti-inflamatório e anti-nociceptivo desse gás (Ekundi-Valentim et al., 2010). Além disso, Distrutti et al. (2010), em modelo de nocicepção visceral, induzida por distensão colorretal, demonstraram redução da nocicepção via tratamento dos animais com o doador de H_2S , o sulfeto de sódio (Na_2S). Esse efeito foi relacionado à participação do sistema opioide, via ativação do receptor opioide tipo μ .

Todavia, o conhecimento relacionado aos mecanismos de ação do H_2S na modulação do processo nociceptivo são escassos; no entanto, alguns mecanismo pairam sobre as vias de sinalização envolvendo canais iônicos, entre eles, canais de cálcio do tipo T ou canais de K^+ dependentes de ATP (Smith, 2009).

Por seu turno, semelhantemente à dor aguda, a coceira funciona como mecanismo de proteção para o organismo, pois anuncia a presença, bem como permite a remoção de insetos, substâncias irritantes ou outros estímulos potencialmente prejudiciais, que tenham ultrapassado a barreira epidérmica e penetrado na pele (Bíró et al., 2007; Steinhoff et al., 2006).

1.5 Justificativa para realização deste estudo

A dor e o prurido, embora apresentem algumas vias sensoriais e interconexões neurais distintas e, em diversos aspectos controversos, são sensações que auxiliam na defesa do organismo (Schmelz, 2010). Apesar dos recentes avanços na terapia do prurido, particularmente, com a classe de fármacos anti-histamínicos, ainda não existe uma terapia farmacológica satisfatória para todos os pacientes e, em particular, para o prurido crônico, como o observado na dermatite atópica. Isto sugere que mecanismos alternativos periféricos estão envolvidos na condução do prurido (Handwerker, 2010).

Não obstante, os mecanismos de ação envolvidos no fenômeno da coceira são discrepantes e dependem do estímulo. Por conseguinte, a descoberta e delineamento de novos candidatos alternativos e/ou complementares para a terapia da coceira aguda ou crônica se faz necessária. Nesse sentido, é importante ressaltar que nenhuma evidência epidemiológica/clinica e tampouco farmacológica mostrou, até o presente momento, o papel do H₂S endógeno no controle sensorial da coceira, apesar da sua implicação em respostas nociceptivas e inflamatórias em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (Distrutti et al., 2006; Spiller et al., 2010; Wallace et al., 2009; Zanardo et al., 2006).

Sabendo que o mecanismo funcional operante no sistema *in vivo* é bem mais complexo, especialmente em mecanismos relacionados às mudanças do estado fisiológico para o patológico, acreditamos que o desenvolvimento de um projeto experimental em que haja a associação de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* é fundamental para a melhor compreensão dos processos fisiopatológicos e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos relacionados ao prurido.

1.6 Objetivo

Os objetivos deste estudo consistem em:

- Avaliar os efeitos da suplementação exógena de H_2S , via administração de doadores desse gás, no prurido e em alguns parâmetros da resposta inflamatória (extravasamento plasmático e aumento da atividade de MPO) induzidos pela injeção i.d. de histamina ou composto 48/80 (C48/80) na pele dorsal de camundongos BALB/c;
- Investigar a expressão das enzimas CBS e CSE envolvidas na síntese de H_2S na pele *naïve* e inflamada e, ainda, avaliar a cinética de geração desse gás na pele.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Os experimentos foram realizados sob aprovação do projeto pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB (protocolo nº 33, fls. 85, livro 02/2010) da Universidade de São Paulo, cujas normas estão de acordo com os princípios do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados camundongos machos isogênicos BALB/c (20 – 35 g) obtidos do Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia, ICB/USP, mantidos com água e ração *ad libitum*, sob temperatura controlada (22 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas).

2.2 Indução do prurido (coceira) na pele dorsal de camundongos

Para a indução do prurido, utilizou-se doses de histamina (1 µmol/sítio) ou C48/80 (100 µg/sítio) baseadas em estudos pilotos do grupo ou obtidos de dados da literatura (Bell et al., 2004; Han et al., 2006; Kuraiashi et al., 1995; Sugimoto et al., 1998).

Após anestesia dos animais pela via inalatória com a mistura de isoflurano e oxigênio (1:3), a pele dorsal desses foi depilada e uma única injeção intradérmica (i.d.), no volume de 50 µl, de histamina (1 µmol), C48/80 (100 µg) ou respectivo veículo (Tyrode) foi realizada na região dorsal cervical (próxima ao pescoço; Costa et al., 2006). Para avaliar os efeitos dos doadores de H₂S, os sítios injetados com histamina ou C48/80 foram coinjetados com doses crescentes dos doadores de H₂S, dentre eles o Na₂S (0,3–10 nmol/sítio) e LR (0,3–30 nmol/sítio). Imediatamente após a injeção i.d. dos agentes testes, os animais foram transferidos para caixas individuais de acrílico transparente (12 x 20 x 17 cm, Insight; Ribeirão Preto; SP) mantidas em sala isenta de barulho e adaptada para filmagem, onde foram previamente aclimatizados durante dois dias por período de 30 min.

A medida dos episódios (comportamento) de prurido ou coceira foi avaliada com base no critério de ataques de coceira, definindo como um evento isolado de três ou mais movimentos rápidos de toque na região dorsal com as

patas traseiras (Costa et al., 2006; Dunford et al., 2007). O registro do comportamento de coceira foi efetuado continuamente por 40 min, para no máximo, três animais por vez, com o auxílio de câmara filmadora (Samsung DV Mod. SC-D382).

A contabilização do número de ataques de coceira, obtido nas filmagens foi visualizada em computador (Dell Vostro 1320, com auxílio do software Windows Media Player), sendo também realizada manualmente por dois investigadores treinados e alheios aos protocolos. Os resultados foram expressos como número (absoluto) do movimento de ataques de coceira obtidos no intervalo de 40 min.

2.3 Avaliação do extravasamento plasmático na pele dorsal de camundongos

A análise do efeito dos doadores de H_2S sobre o extravasamento plasmático induzido por histamina ou C48/80 foi feita com base em estudos pilotos de curvas dose-resposta do grupo ou obtidos de dados da literatura (Ferreira et al., 2009; Palframan et al., 1996). Para isto, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com uretano (2, 5 g/Kg) e a pele foi depilada na região da pele dorsal. Na veia caudal foram injetados 100 μ l de albumina bovina marcada com I^{125} (0,037 MBq/ μ g) e sítios aleatórios, no máximo seis, foram marcados na pele dos animais e injetados pela via i.d. com histamina (30 nmol), C48/80 (3 μ g) e Tyrode (50 μ l), na ausência e presença de doses crescentes dos doadores de H_2S : Na_2S (1 – 100 nmol) ou LR (1 – 300 nmol).

Após um intervalo de 30 minutos da injeção, amostras de sangue (0,5–1,0 ml) foram coletadas, via punção cardíaca, e centrifugadas (5 min, 10.000 g) para obtenção do plasma (200–500 μ l). Os animais foram mortos por superdosagem anestésica seguida de deslocamento cervical. Os sítios de pele injetados foram removidos (diâmetro de 0,8 cm), limpos, pesados e levados ao contador gama (Packard Bioscience, Meriden, CT, EUA) juntamente com 100 μ l do plasma.

A medida de extravasamento plasmático na pele dos animais foi mensurada pelo acúmulo extravascular de albumina bovina marcada com I^{125}

na pele e esta foi expressa como $\mu\text{l/g}$ de tecido, com base na relação entre a contagem (cpm) obtida no plasma (100 μl) e a contagem obtida por peso (g) do tecido removido.

2.4 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Grupos de animais foram preparados e tratados conforme descrito no item 2.3. Após o intervalo de 4 h, estes foram mortos e os sítios da pele injetados foram removidos, pesados e homogeneizados em solução tampão (1 ml/50 mg de pele) contendo o detergente brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB; 50 mg/ml em tampão fosfato de potássio, pH 6,0). Após dois ciclos (45 s/ciclo) de homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 g, 10 min, 4 °C) e aquecidas (60 °C) por 2 h para inativação da catalase endógena (Ohta et al., 2003).

O sobrenadante de cada amostra (10 μl) foi incubado com o tampão fosfato de potássio (200 μl ; 50 mM; pH 6,0) contendo 0,164 mg/ml de dihidroclorato de o-dianisidina em H_2O_2 (0,0005 %, pH 6) (Bradley et al., 1982). A reação nas amostras foi analisada via leitura de densidade óptica (DO, 460 nm) em leitor Elisa (Spectra Max plus 384, Sunnyvale, CA, EUA), e a atividade da MPO nas amostras foi calculada em relação ao peso do tecido (mg), conforme a fórmula: $\text{MPO (U/mg)} = \text{Vmax/s} \times 60/0,0113/0,5$, cuja unidade de atividade MPO é definida como aquela capaz de degradar um μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$.

2.5 Cinética da atividade enzimática da CSE e CBS na pele *naive* de camundongos

Amostras da pele dorsal *naive* de camundongos BALB/c foram obtidas e homogeneizadas em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo o inibidor de protease fenil-metil-sulfonil-fluoridro - PMSF (0,5 M; 20 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$) na proporção 1:10 (1 g de tecido para 10 ml de tampão). O homogenato obtido foi centrifugado (10.000 g; 10 min, 4 °C) e o sobrenadante coletado para medida de atividades das enzimas CSE e CBS, ambas envolvidas na síntese de H_2S .

A medida foi realizada via metodologia colorimétrica (azul de metileno; Stipanuk e Beck, 1982), a qual sofreu ligeiras modificações pelo nosso grupo. Para isto, amostras do sobrenadante do homogenato (400 µl) foram dispostas em tubos de vidro (10 ml) contendo 50 µl do inibidor da CSE, PGly (DL-propargilglicina, 2 mM) ou da CBS, CHH (o-carboximetil-hidroxilamina-hemihidratado, 3 mM) e mantidos por 20 min em temperatura à 37 °C. A seguir, volumes de 25 µl do substrato L-cisteína (10 mM) e do co-fator 5' fosfato de pirodoxal (2 mM) foram adicionados ao tubo de vidro. Cuidadosamente, um pequeno tubo plástico (2 ml) contendo papel filtro (1 x 3 cm) embebido em acetato de zinco (200 µl/1%) foi inserido no interior do tubo de vidro, posteriormente submetido à descarga gasosa de nitrogênio (~20 s) e imediatamente fechados hermeticamente.

A determinação da cinética de geração de H₂S na pele dos animais foi realizada nos intervalos de 60, 90 e 120 min. Essa reação foi interrompida pela adição de HCl (500 µl; 8,5 M) nas amostras. Após o intervalo de 1 h, os tubos plásticos contidos no interior dos tubos de vidro foram removidos e, em cada tubo, adicionou-se o volume de 200 µl da solução de ácido tricloroacético (10 %) contendo o cloridrato de N, N-dimetil-*p*-fenilenodiamina (10 mM em HCl 7,2 M) e FeCl₃ (15 mM em HCl 1,2 M) na proporção de 2:1:1. A seguir, essa solução foi incubada por 20 min (37 °C) e, depois, misturada aos volumes de 600 µl de álcool butílico e 50 µl de solução saturada de NaCl.

Essa mistura foi novamente submetida à centrifugação (10.000 g, 10 min) e amostras de 200 µl do sobrenadante (em duplicata) foram dispostas em placa de 96 poços e submetidas à leitura em fluorímetro (Spectra Max Gemini XS Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) sob comprimento de onda de 290 nm de excitação e 695 nm de emissão. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UA) em relação ao tempo.

2.6 Avaliação da expressão protéica, via Western Blot, das enzimas CSE e CBS na pele naive e tratada de camundongos

Amostras da pele de camundongos foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) contendo o coquetel de inibidores de protease (1:1000, Sigma) e PMSF 1 mM (10 ml/g de tecido). Após centrifugação (5 min,

10.000 g), as amostras foram diluídas em tampão de homogeneização para um volume q.s.p de 130 µl e, depois, adicionadas ao volume de 30 µl do tampão Laemmli (Tris-HCL 62,5 mM, pH 6,8 com SDS 2 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,001 % e 2-mercaptoetanol 5 %).

As proteínas totais das amostras foram separadas em sistema de eletroforese em gel de poliacrilamina (7 % SDS-PAGE) com o auxílio de tampão específico (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 %), numa intensidade de corrente constante de 35 mA, voltagem ~100-180 V (Laemmli, 1970). Para determinar a melhor quantidade de proteínas a ser utilizada nas análises subsequentes, inicialmente amostras de pele *naïve* (contendo 2,5 – 25 µg de proteínas), juntamente com amostras controle (10 µg de proteínas) de cérebro, fígado e rim foram aplicados no sistema de eletroforese. Nas análises posteriores, o efeito dos tratamentos dos sítios da pele com C48/80 e LR (item 2.4) foi determinado utilizando-se 10 µg de proteínas.

Após o ensaio via sistema de eletroforese submerso para membrana de nitrocelulose (150 mA, ~40 V, 2 h), as bandas protéicas foram transferidas utilizando-se o tampão Tris (25 mM; contendo glicina 192 mM, SDS 0,1 % e etanol 18 %). A eficiência da transferência foi confirmada após revelação da coloração das membranas por vermelho ponceau (0,1 % em ácido acético 5 %). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados pela adição da solução caseína (0,2 %) em tampão TBS-t (Tri-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0,2%; pH 7,4) durante 1h.

Por fim, as membranas foram incubadas (~12 h, 18 °C) com anticorpos primários monoclonais anti-CSE (camundongo; 1:1000, *Abnova Novus Biologicals*, Taiwan) e anti-CBS (camundongo; 1:1500, *Abnova Novus Biologicals*, Taiwan). Após seis lavagens subsequentes (~ 10 min) com o TBS-t, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário policlonal anti-mouse IgG conjugado à peroxidase (cabra; diluição 1:3000 em TBS-t, Signalway, EUA) durante 2h em temperatura ambiente. As membranas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens em TBS-t (6x por 10min) e as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência (SuperSignal West pico, Thermo Scientific, EUA).

As imagens das bandas foram captadas pelo detector de imagens Chemilmager 5500 (Alpha Innotech Corporation, EUA) e suas intensidades

foram estimadas através de análise densitométrica. Os resultados obtidos foram normalizados pelo controle interno (β -actina, monoclonal de camundongo 1:2000, Santa Cruz) e expressos como percentagem de variação em relação ao controle (Tyrode)

2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. e submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA) seguido pelo teste de *Dunnett*. As diferenças entre as médias foram avaliadas via programa estatístico (Programa Graph Pad Prism v. 5.0). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Estudos in vivo: avaliação da sensação de coceira e do extravasamento plasmático na pele dorsal de camundongos

3.1.1 Curva dose-efeito do sulfeto de sódio no prurido induzido por histamina e C48/80 na pele dorsal de camundongos

Para indução do comportamento de prurido, doses de histamina e C48/80, baseadas em dados da literatura (Bell et al., 2004; Dunford et al., 2007) ou em estudos preliminares do laboratório foram utilizadas. No intervalo de 40 min, a injeção i.d. de histamina (1 $\mu\text{mol/sítio}$, $n=10$; Figura 3, painel A) ou C48/80 (100 $\mu\text{g/sítio}$, $n=13$; Figura 3, painel B) em camundongos BALB/c machos produziu um comportamento significativo ($P<0,001$) de ataques de coceira/prurido em relação aos animais que receberam a injeção i.d. do veículo (Tyrode).

A coinjeção do Na_2S , nas doses de 1 nmol/sítio ($n=9$) e 3 nmol/sítio ($n=5$), com histamina (1 $\mu\text{mol/sítio}$) produziu redução significativa (68% e 81%, respectivamente; $P<0,05$) do prurido evocado pela injeção isolada de histamina (Figura 3, painel A). A coinjeção i.d. do Na_2S , na menor (0,3 nmol/sítio , $n=5$) ou maior dose (10 nmol/sítio , $n=9$) avaliada, não afetou o prurido induzido por histamina (Figura 3, painel A). Quando administrado isoladamente, o Na_2S , na maior dose (10 nmol/sítio , i.d. $n=8$), não induziu ataques de coceira, sendo esta resposta semelhante ao Tyrode (Figura 3, painéis A e B).

A figura 3 (painel B) ilustra que, a coinjeção de Na_2S , nas doses de 0,3; 1; 3 e 10 nmol/sítio ($n=11$, 13, 11 e 6) com C48/80 (100 $\mu\text{g/sítio}$), não reduziu significativamente os ataques de coceira frente ao C48/80 administrado isoladamente via i.d.

Figura 3 – Curva dose-efeito do Na_2S na coceira/prurido induzido pela injeção i.d. de histamina ou C48/80 na pele dorsal de camundongos.

As barras dos painéis A e B mostram os números de ataques de coceira no intervalo de 40 min pós injeção i.d. de histamina (1 $\mu\text{mol/sítio}$) e C48/80 (100 $\mu\text{g/sítio}$), respectivamente, na ausência ou presença de doses crescentes de Na_2S (0,3–10 nmol/sítio, $n=5-13$). As barras brancas e negras mostram o efeito do veiculo (Tyrode) e do Na_2S , respectivamente, administrados isoladamente. Os dados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m. para n animais. *** $P<0,001$ vs. Tyrode, # $P<0,05$ vs. histamina. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

FONTE: Rodrigues (2012)

3.1.2 Curva dose-efeito do reagente de Lawesson no prurido induzido pela injeção i.d. de histamina e C48/80 na pele dorsal de camundongos

Conforme demonstrado anteriormente, a injeção i.d. de histamina (1 μ mol/sítio, n=9) ou C48/80 (100 μ g/sítio, n=6) produziu ataques de coceira significativamente maiores do que o provocado pela injeção i.d. de seu veículo, Tyrode ($P<0,001$ e $P<0,01$; respectivamente, n=6) no intervalo de 40 min (Figura 4, painéis A e B).

Na vigência da coinjeção do LR, nas doses de 3 nmol/sítio (n=6), 10 nmol/sítio (n=6) e 30 nmol/sítio (n=6) com a histamina, foi possível observar redução significativa (47% - 62,5%; $P<0,05$ - $P<0,01$) no número de ataques de coceira, quando comparado com a histamina isolada (Figura 4, painel A). Nas doses menores (0,3 nmol/sítio (n=6) e 1 nmol/sítio (n=6), o LR não afetou os ataques de coceira induzidos por histamina (Figura 4, painel A).

A coceira induzida pelo C48/80 não foi afetada pela coinjeção com o LR, nas diferentes doses utilizadas (0,3 nmol/sítio; n=6, 1 nmol/sítio; n=6, 3 nmol/sítio; n=6, 10 nmol/sítio; n=4 e 30 nmol/sítio; n=4, Figura 4, painel B).

Figura 4 – Curva dose-efeito do LR na coceira/prurido induzido pela injeção i.d. de histamina ou C48/80 na pele dorsal de camundongos.

As barras dos painéis A e B mostram os números de ataques de coceira no intervalo de 40 min pós injeção i.d. de histamina (1 μmol/sítio) e C48/80 (100 μg/sítio), respectivamente, na ausência ou presença de doses crescentes de LR (0,3–30 nmol/sítio, n=4-6). As barras brancas mostram o efeito do veículo (Tyrode), administrado isoladamente. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. **P<0,01 ou ***P<0,01 vs. Tyrode, #P<0,05 ou ##P<0,01 vs. histamina. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

FONTE: Rodrigues (2012)

3.1.3 Curva dose-efeito dos doadores de H_2S no extravasamento plasmático produzido pela injeção i.d. de histamina na pele dorsal de camundongos

A injeção i.d. de histamina, em escala log (3, 10 e 30 nmol/sítio; n=4), na pele dorsal de camundongos, evocou extravasamento plasmático de maneira dependente da dose, sendo a resposta da dose de 30 nmol/sítio, significativamente maior ($P<0,01$) em relação ao veículo Tyrode (n=4; Figura 5, painel A).

A coinjeção do Na_2S , nas doses de 10, 30 e 100 nmol/sítio (n=5) ou LR na dose de 10 nmol/sítio (n=4), com a histamina (30 nmol/sítio) promoveu, em ambos os casos, redução significativa ($P<0,05$) do extravasamento plasmático induzido por histamina (Figura 5, painéis C e E). Quando administrado pela via i.d. isoladamente, o Na_2S (100 nmol/sítio, n=5) não induziu extravasamento plasmático (Figura 5, painel C).

Nas doses de 1 e 3 nmol/sítio (n=7), a coinjeção do Na_2S bem como do LR, nas doses de 1, 3, 30 e 100 nmol (n=4-5), não reduziram de forma significativa o extravasamento plasmático induzido pela histamina (Figura 5, painéis B, D e E).

Figura 5 – Curva dose-efeito do Na_2S e LR no extravasamento plasmático induzido pela injeção i.d. de histamina na pele dorsal de camundongos.

As barras do painel A mostram o extravasamento plasmático pós injeção i.d. de histamina (3, 10 e 30 mol/site; n=4), nos painéis B, C, D e E as barras correspondem a resposta para dose de 30 nmol de histamina/site, na ausência ou presença de doses crescentes de Na_2S (1–100 nmol/site; n=5–7), ou LR (1–100 nmol/site; n=4–5). As barras brancas e negras mostram o efeito do veículo (Tyrosine) e do Na_2S , respectivamente, administrados isoladamente. Os dados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m. para n animais. ** $P < 0,01$ ou *** $P < 0,001$ vs. Tyrosine, # $P < 0,05$ vs. Histamine. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

FONTE: Rodrigues (2012)

3.1.4 Curva dose-efeito dos doadores de H₂S no extravasamento plasmático produzido pela injeção i.d. de C48/80 na pele dorsal de camundongos

A injeção i.d. de C48/80 (3 µg/sítio) na pele dorsal de camundongos induziu extravasamento plasmático significativo ($P < 0,001$; $n = 6-8$) na pele desses animais quando comparado ao Tyrode (Figura 6, painéis A e B). Quando o C48/80 foi coinjetado com o Na₂S, nas doses de 30 e 100 nmol/sítio ($n = 6$), observou-se acentuada redução, embora não dependente da dose, do extravasamento plasmático induzido por este agente (Figura 6, painel A). Já na menor dose do Na₂S (10 nmol/sítio; $n = 6$), não houve redução do extravasamento plasmático produzido pelo C48/80 (Figura 6, painel A).

Da mesma forma, o extravasamento plasmático induzido pelo C48/80 foi significativamente inibido pela coinjeção com o LR, nas doses de 30, 100 e 300 nmol/sítio ($n = 8$; $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,05$), muito embora o perfil de inibição também não foi dependente da dose (Figura 6, painel B). Na dose de 10 nmol/sítio ($n = 8$), o LR não inibiu o extravasamento plasmático induzido pelo C48/80 quando comparado ao composto isoladamente (Figura 6, painel B).

Figura 6 – Curva dose-efeito do Na_2S e LR sobre o extravasamento plasmático induzido pela injeção i.d. de C48/80 na pele dorsal de camundongos.

As barras dos painéis A e B mostram o extravasamento plasmático pós injeção i.d. de C48/80 (3 μg/sítio) na ausência ou presença de doses crescentes de Na_2S (10–100 nmol/sítio; n=6) e LR (10–300 nmol/sítio; n=8). As barras brancas mostram o efeito do veículo (Tyrode) administrado isoladamente. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. ***P<0,001 vs. Tyrode, #P<0,05 ou ##P<0,01 vs. C48/80. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

FONTE: Rodrigues (2012)

3.1.5 Curva dose-efeito dos doadores de H_2S no aumento de atividade da mieloperoxidase (MPO) induzido por C48/80 na pele dorsal camundongos

A injeção i.d. do C48/80 (3 μ g/sítio; n=5-8) na pele dorsal dos animais causou, após 4 h, aumento da atividade da MPO ($P<0,001$) quando comparado ao Tyrode (Figura 7, painéis A e B).

A coinjeção do C48/80 com o Na_2S , nas doses de 3 e 10 nmol/sítio (n=5-8), reduziu significativamente ($P<0,05$) o aumento da atividade da MPO induzido pelo C48/80 (Figura 7, painéis A e B). Nas doses de 1 nmol/sítio (n=8; Figura 7, painel A), 30 ou 100 nmol/sítio (n=5; Figura 7, painel B), o tratamento com o Na_2S não afetou o aumento da atividade da MPO evocado pelo C48/80.

A coinjeção i.d. do LR, nas doses de 10 e 30 nmol/sítio (n=10), com o C48/80 reduziu significativamente ($P<0,05$) o aumento da atividade da MPO induzido por esse composto. Já na dose de 100 nmol/sítio (n=10), o LR não reduziu significativamente o aumento da atividade da MPO evocado pelo C48/80 (Figura 8).

Figura 7 – Curva dose-efeito do Na_2S na atividade da enzima mieloperoxidase induzida pela injeção i.d. de C48/80 na pele dorsal de camundongos.

As barras dos painéis A e B mostram atividade da mieloperoxidase 4 h pós injeção i.d. de C48/80 (3 µg/sítio), na ausência ou presença de doses crescentes de Na_2S (1–100 nmol/sítio, n=5–8). As barras brancas demonstram o efeito do veículo (Tyrode), administrado isoladamente. Os dados estão apresentados como média $\pm$ e.p.m. para n animais. **P<0,01 ou ***P<0,001 vs. Tyrode, #P<0,05 vs. C48/80. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

FONTE: Rodrigues (2012)

Figura 8 – Curva dose-efeito do LR na atividade da enzima mieloperoxidase induzida pela injeção i.d. de C48/80 na pele dorsal de camundongos.

As barras mostram atividade da mieloperoxidase 4 h pós injeção i.d. de C48/80 (3 µg/sítio), na ausência ou presença de doses crescentes de LR (10 – 100 nmol/sítio; n=10). A barra branca demonstra o efeito do veículo (Tyrode), administrado isoladamente. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. ***P<0,001 vs. Tyrode, #P<0,05 vs. C48/80. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

FONTE: Rodrigues (2012)

3.2 Estudo *in vitro*: avaliações de parâmetros bioquímicos

3.2.1 Cinética de atividade das enzimas geradoras de H_2S na pele naíve dorsal de camundongos

Conforme ilustra a figura 9 (painel A), o aumento da medida de fluorescência (UA) no homogenato da pele naíve de camundongos, nos intervalos de 60, 90 e 120 min, foi tempo-dependente. Na presença dos inibidores da CBS (CHH 3 mM; n=3) e CSE (PGly 2 mM; n=3), esse aumento em todos os tempos avaliados (60, 90 e 120 min) foi reduzido quando comparado ao valor de fluorescência (UA) obtido na pele do grupo não tratado com os inibidores (n=3).

Os mesmos resultados expressos na figura 9 (painel A), estão expressos nos painéis B, C e D como a relação entre a geração basal de H_2S na pele naíve e os diferentes intervalos avaliados (60, 90 ou 120 min) consistente com a medida de fluorescência (UA) na ausência e presença dos inibidores de CBS e CSE. A redução da geração basal de H_2S pelo CHH ou PGly foi observada em todos os períodos, sendo a inibição produzida por CHH significativamente maior ($P < 0,01$; n=3; Figura 9, painéis A-D).

Figura 9 – Cinética das atividades enzimáticas da CSE e CBS na pele dorsal naíve de camundongos.

Amostras de homogenatos de pele naíve foram pré-incubadas (-20 min) com PGly (inibidor da CSE, 2 mM), CHH (inibidor da CBS, 3 mM) e o respectivo controle (veículo). O painel A ilustra a cinética da medida de fluorescência (UA) no homogenato da pele naíve de camundongos, na presença e ausência dos inibidores CHH e PGly, nos intervalos de 60, 90 e 120 min. Os painéis B, C e D representam a extrapolação da relação entre a geração de H₂S e tempo da reação em 60, 90 e 120 min. Os resultados foram plotados com base na equação $Y = B_{max} \cdot X / (K_d + X)$, e estão expressos como unidades arbitrárias de fluorescência de excitação (DO 290 nm) e emissão (DO 695 nm). Os dados dos painéis B, C e D representam a relação da síntese de H₂S em função do tempo e estão expressos como média $\pm$ e.p.m. ** $P < 0,01$ vs. Controle. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

FONTE: Rodrigues (2012)

3.2.2 Expressão protéica (Western blot) das enzimas geradoras de H₂S na pele dorsal naïve e tratada de camundongos

A análise de Western blot revelou que ambas enzimas geradoras de H₂S, CBS e CSE, estão expressas de forma semelhante na pele naïve de camundongos (Figura 10, painéis A e B). O aumento na expressão dessas enzimas, medido pela intensidade das bandas de peso molecular 73 kDa e 72 kDa, respectivamente, ocorreu de maneira proporcional (dose-dependente) à quantidade de proteínas obtida do homogenato de pele. Ainda, nas amostras dos tecidos controle (cérebro, fígado e rim), a expressão das enzimas CBS e CSE para a mesma quantidade de proteína avaliada na pele (10 µg) foi menor (Figura 10, painéis A e B). Ademais, tanto no fígado quanto no rim, observou-se duas bandas imunorreativas para a isoforma CSE (Figura 10, painel B).

A figura 11 (painéis A e B) demonstra que a injeção i.d. do C48/80 (3 µg/sítio), não afetou de forma significativa a expressão protéica das enzimas CBS (painel A, n=4) e CSE (painel B, n=3) quando comparada à expressão protéica dessas enzimas na pele tratada com o veículo (Tyrode). A co-injeção i.d. do LR (10 – 100 nmol/sítio) com o C48/80 na pele de camundongos também não modificou de forma significativa a expressão protéica das enzimas CBS (n=4) ou CSE (n=3) em comparação as amostras dos sítios em que C48/80 foi administrado isoladamente (Figura 11, painéis A e B).

Figura 10 – Análise da expressão protéica (Western blot) das enzimas CBS e CSE na pele naive dorsal de camundongos.

Painel A ilustra membrana representativa contendo as bandas imunorreativas para CBS, enquanto o painel B ilustra membrana representativa com as bandas imunorreativas para CSE. Da esquerda para direita 2,5, 5, 10, 20 e 25 μ g de proteínas totais de pele, juntamente com 10 μ g de proteínas totais para cérebro, fígado e rim.

FONTE: Rodrigues (2012)

Figura 11 – Efeito do tratamento com LR sobre a expressão protéica das enzimas CBS e CSE na pele de camundongos.

Painéis A e B ilustram as membranas representativas (Western blot) contendo bandas imunorreativas para CBS (n=4) e CSE (n=3), juntamente com o controle interno β-actina. As análises densitométricas representam a expressão proteica dos diferentes grupos em relação ao Tyrode (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

FONTE: Rodrigues (2012)

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi dado enfoque, particularmente, à avaliação do potencial anti-pruriginoso e anti-inflamatório da suplementação exógena de doadores do gás H_2S no comportamento de coceira e do aumento de permeabilidade microvascular (extravasamento plasmático) induzido por agentes capazes de causar prurido e inflamação cutânea, como a histamina e C48/80, na pele dorsal de camundongos (Costa et al., 2006; Hossen et al., 2006; Inagaki et al., 2002; Kuraishi et al., 1995; Shim et al., 2007) e humanos (Hosogi et al., 2006; Rukwied et al., 2000; Ward et al., 1996).

Destaca-se que o camundongo da linhagem BALB/c foi escolhido como animal de experimentação, por apresentar determinadas semelhanças com a espécie humana, no que se refere ao comportamento de coceira promovido por mediadores clássicos, como a histamina (via seus receptores histaminérgicos) e a ferramenta farmacológica C48/80, com conhecida habilidade de causar desgranulação de mastócitos, liberando seus conteúdos endógenos, dentre eles a histamina e 5-HT (Ferry et al., 2002; Hino et al., 1977; Paton, 1951). Outras vantagens oferecidas por esse modelo biológico incluem a facilidade de obtenção de populações homogêneas quanto ao sexo e idade, bem como a possibilidade futura de estudos em animais geneticamente modificados ou nocautes de moléculas sinalizadoras ou receptores envolvidos.

Classicamente, o prurido induzido pela injeção s.c. ou i.d. de histamina ou C48/80 em camundongos foi descrito pela ação direta desse agonista ou indireta do C48/80 nos receptores H_1 (Fjellner e Hägermark, 1982; Sugimoto et al., 1998), uma vez que a utilização de antagonistas desses receptores reduz significativamente o prurido (Hägermark et al., 1979; Hosogi et al., 2006; Simons et al., 1984). Posteriormente, evidências demonstraram que, além dos receptores H_1 , o prurido desencadeado por ação direta da histamina ou indireta do C48/80 envolve a participação dos receptores H_4 , pois o antagonista desses receptores (JNJ 7777120) inibiu marcadamente o comportamento de coceira evocado por esses agentes (Dunford et al., 2007; Yamaura et al., 2009).

Por seu turno, semelhantemente a dor, sabe-se que o prurido é uma modalidade sensorial e, segundo alguns estudos recentes do grupo e de outros autores, a suplementação exógena ou a modulação de H_2S endógeno foi

capaz de influenciar a dor ou comportamentos relacionados (alodinia, hiperalgesia) em diferentes modelos experimentais (Distrutti et al., 2010; Ekundi-Valentim et al., 2010; Maeda et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Okubo et al., 2011; Zanardo et al., 2006), muito embora haja resultados contraditórios no que se refere ao efeito anti ou pró-nociceptivo do H_2S .

Todavia, nenhum estudo foi descrito sobre o papel do H_2S exógeno ou endógeno (ou seus produtos de síntese) no prurido observado em condições patológicas ou não. Com isto em mente e de posse do conhecimento de doses de histamina e C48/80 capazes de evocar o comportamento significativo de coceira e/ou extravasamento plasmático na pele dorsal de camundongos, foi possível demonstrar e afirmar, pela primeira vez, que o tratamento local (co-injeção) com doadores de H_2S , o Na_2S e LR, reduz significativamente o comportamento de coceira induzido pela histamina. Quando esses agentes doadores de H_2S foram administrados isoladamente, o número de ataques de coceira foi similar ao do sítio injetado somente com o veículo, Tyrode. Isto demonstra que esses agentes *per se* não interferem com as fibras nervosas ou receptores envolvidos no comportamento de coceira na pele de camundongos.

Tanto no caso do tratamento com Na_2S quanto do LR, observa-se que estes exibiram um perfil bifásico de resposta inibitória sobre a coceira evocada por histamina, onde foi claro a diferença estatística para o Na_2S , nas doses de 1 e 3 nmol/sítio, mas não em doses maiores que 3 ou inferiores a 1 nmol/sítio. Da mesma forma, o LR somente interferiu de forma significativa no fenômeno da coceira, quando administrado nas doses de 3 a 30 nmol/sítio; porém, tanto a dose menor quanto a maior dose descritas aqui não afetaram significativamente o número de ataques de coceira evocado pela histamina nos animais. É interessante ressaltar que o mesmo padrão de resposta inibitória bifásica foi descrito por outros estudos em modelos distintos (Elrod et al., 2007; Ji et al., 2008; Johansen et al., 2006; Sidhapuriwala et al., 2009). Por exemplo, segundo Elrod et al. (2007), o tratamento dos animais com o Na_2S , na dose de 50 $\mu g/kg$, mas não nas doses menores e maiores do que essa, reduziu marcadamente o tamanho da área infartada do miocárdio num modelo de isquemia e reperfusão em ratos. De forma semelhante, Sidhapuriwala et al. (2009) demonstraram que o NaHS, quando administrado na dose de 10 mg/kg, mas não em doses menor (5 mg/kg) ou maior (15 mg/kg), promoveu efeito anti-

inflamatório importante no modelo de pancreatite induzido por ceruleína em camundongos.

No presente estudo e nos demais da literatura, verifica-se que as doses utilizadas de ambos os compostos doadores de H_2S (Na_2S e LR) são equimolares, mas nunca equipotentes. Assim, é possível que as diferenças no perfil dose/resposta do Na_2S e LR estejam relacionadas às características físico-químicas de cada composto. Em particular, a biodisponibilidade entre o LR e Na_2S pode atuar como ponto chave para explicar as diferenças de dose-efeito do Na_2S e LR sobre o prurido induzido pela injeção i.d. de histamina na pele de camundongos (Whiteman & Winyard, 2011). Coletivamente, fornecemos evidências originais e adicionais de que doadores exógeno de H_2S exercem, também, ações anti-pruriginosas, as quais são grandemente influenciadas pelas dosagens dos doadores de H_2S utilizadas, assim como observado em outros modelos animais descritos acima.

Em continuidade ao estudo, avaliou-se a capacidade dos doadores de H_2S inibirem o comportamento de coceira induzido pela liberação indireta de histamina de mastócitos, via emprego da ferramenta farmacológica C48/80. Dentro do complexo efeito farmacológico induzido pela injeção i.d. do C48/80 na pele de animais e humanos, são múltiplas e conhecidas as possibilidades desta causar efeitos pruritogênico e inflamatório, seja por ação indireta via estimulação de fibras nervosas (Inagaki et al., 2002) ou indireta, via ação desgranuladora de mastócitos. Estas são células que possuem e liberam vastos conteúdos de histamina, serotonina, proteínas catiônicas, entre outros (Friedrich et al., 1984; Patel e Dong, 2011).

Curiosamente, o tratamento local da pele com os doadores de H_2S , Na_2S e LR, nas mesmas doses efetivas (ou não) para inibir a coceira induzida por histamina, não reduziu de forma significativa o comportamento de prurido exercido pela administração i.d. do C48/80. A discrepância entre o efeito anti-pruriginoso desses doadores de H_2S sobre o prurido da histamina e do C48/80 não está bem claro. Contudo, sabe-se que a desgranulação de mastócitos, leva à liberação de histamina juntamente com serotonina, triptase, entre outros mediadores irritantes (Friedrich et al., 1984; Patel e Dong, 2011). Além da resposta pruriginosa mediada por histamina e serotonina, evidências sugerem que o C48/80 induz coceira dependente de mecanismos mediado por triptase

(Costa et al., 2008; Kim et al., 2008; Weisshaar et al., 1997; Yamaguchi et al., 1999;).

Por outro lado, é evidente notar que além da sopa de mediadores liberados dos mastócitos, o número de ataques de coceira induzida pela injeção i.d. de histamina foi significativamente menor (aproximadamente três vezes) do àquele observado pela injeção i.d. do C48/80. Desta feita, é possível especular que além da complexidade de mediadores envolvidos na resposta pruriginosa evocada pelo C48/80, a biodisponibilidade local do H_2S oriundo das mesmas doses efetivas administradas do LR e Na_2S para inibir a coceira evocada pela histamina, possa não ser suficientemente alta para bloquear o potente comportamento de coceira induzido pelo C48/80 na pele dos camundongos BALB/c. Somado à isto, os diferentes mecanismos pelos quais o C48/80 induz o prurido podem, também, explicar em parte, a ausência de efeito dos doadores de H_2S nos ataques de coceira evocados pelo C48/80. Alternativamente, é possível especular que o efeito inibitório do H_2S sobre os ataques de coceira ocorra em algum ponto da via de sinalização induzida por histamina nas fibras sensoriais sensíveis. É interessante ressaltar que, de acordo com trabalho de outros autores, o C48/80 possui um mecanismo alternativo de indução de coceira, independentemente dos conteúdos liberados de mastócitos, pois os mesmos observaram que camundongos deficientes de mastócitos (WBB6F1-W/W^V) exibiram um comportamento significativo de coceira frente à administração i.d. de C48/80 em relação ao seu veículo (Inagaki et al., 2002).

Apesar do caráter inédito dos resultados apresentados neste estudo, no que tange ao fenômeno de prurido/coceira, não existe qualquer menção na literatura sobre o possível mecanismo de ação do H_2S (exógeno ou endógeno) no efeito inibitório da coceira frente a estímulos capazes de provocar esse efeito. Sabendo disto e ainda que o prurido constitui um sintoma normalmente associado a um processo inflamatório, alguns aspectos da resposta inflamatória, tais como extravasamento plasmático e influxo de neutrófilos (avaliado pela medida da atividade da mieloperoxidase) foram também mensurados na pele dorsal dos mesmos animais.

É conhecido que o aumento da permeabilidade no leito microvascular cutâneo e o consequente extravasamento plasmático é um dos eventos iniciais

da inflamação aguda mediada pela administração i.d. de agentes flogísticos, como a histamina, serotonina e bradicinina na pele de roedores e humanos (Brain e Williams, 1985; Owen et al., 1980; Yshii et al., 2009). Em contrapartida, o bloqueio de receptores para esses mediadores localizados no endotélio de vasos (vênulas pós capilares) com antagonistas específicos, resulta na inibição parcial ou total do extravasamento plasmático (edema), indicando um efeito dependente da ativação dos receptores (Williams et al., 1988).

Admitindo ser válida a relevância do H_2S na inibição do comportamento de coceira e a discrepância relacionada ao efeito pruriginoso evocado pela histamina e C48/80, os resultados adicionais relacionados ao efeito desses doadores de H_2S sobre o extravasamento plasmático evocado pela histamina e C48/80, reforçam essa relevância e demonstram que a resposta inflamatória foi também significativamente reduzida pelo tratamento local com ambos os compostos, Na_2S e LR. Vale acrescentar que, diferentemente da ação anti-pruriginosa, tanto o Na_2S quanto o LR exibiu um perfil inibitório característico dose-dependente sobre o extravasamento plasmático induzido por histamina e C48/80. Ainda, nas doses administradas isoladamente, nenhum dos doadores causou edema (extravasamento plasmático) local, indicando que a suplementação exógena de H_2S , mediada por doadores dessa molécula, promove ação bloqueadora seletiva do aumento de permeabilidade microvascular induzida pela histamina ou C48/80.

No tange ao efeito desses doadores sobre outros processos inflamatórios, alguns trabalhos na literatura mostram dados conflitantes, conforme discutido anteriormente, os quais, em comum, chegam ao consenso de que o efeito protetor do H_2S está relacionado às dosagens e ou concentração local desse local (Whiteman et al., 2011). A presente investigação, além de demonstrar achados originais dos doadores de H_2S , Na_2S e LR, sobre o prurido e extravasamento plasmático evocado por histamina e C48/80 na pele de camundongos BALB/c, procurou ainda evidências que permitissem correlacionar o efeito do prurido com o influxo local de neutrófilos, visto que em casos de prurido associados à psoríase ou dermatite atópica, um número elevado de células inflamatórias (leucócitos) encontra-se na pele desses indivíduos (Nigam et al., 2010; Ozaki et al., 2005).

Os dados deste estudo mostram que a administração i.d. do C48/80 promoveu influxo significativo de neutrófilos após 4 h, quantificado pelo aumento da atividade de MPO na pele dos animais. Esse aumento foi significativamente reduzido pelas doses intermediárias do Na₂S e LR, indicando que a suplementação exógena do H₂S também inibe o influxo de neutrófilos, assim como o extravasamento plasmático evocado por C48/80. O mecanismo envolvido não está bem estabelecido para esse efeito inibitório sobre a migração de células na pele, mas é possível que o aumento na concentração local de H₂S contribui, de forma direta ou indireta, para estabilizar a membrana dos mastócitos e, assim, impedir ou inibir parcialmente a liberação de conteúdos dessas células e, conseqüentemente do influxo de neutrófilos na pele dos animais. Tal sugestão poderia também explicar, em parte, o efeito inibitório dos doadores de H₂S no extravasamento plasmático evocado pelo C48/80. Corroborando nossos achados, resultados prévios de Zanardo et al. (2006) demonstraram que o tratamento de roedores com diferentes doadores de H₂S (Na₂S, NaHS, LR) suprimiu a aderência leucocitária em vênulas mesentéricas, bem como a infiltração de leucócitos em bolsa de ar cutânea ou o edema de pata induzidos por carragenina. Mais recentemente, achados do grupo revelaram que a suplementação exógena de H₂S pelo LR reduziu significativamente as alterações histopatológicas bem como suprimiu o influxo de leucócitos e o aumento da atividade da MPO na sinóvia do joelho de ratos com sinovite induzida por carragenina (Ekundi-Valentim et al., 2010).

Da mesma forma, verificou-se que o Na₂S administrado em dose baixa (1 nmol/sítio) não afetou o aumento da atividade enzimática da MPO evocado pelo C48/80, mas quando aplicado numa dose mais elevada (100 nmol/sítio) exacerbou a atividade dessa enzima. Tais resultados são interessantes e, novamente, corroboram dados da literatura, os quais mostram que altas concentrações de H₂S exercem efeitos pró-inflamatórios, enquanto baixas concentrações exercem efeitos anti-inflamatórios (Szábo, 2007; Trevisani et al., 2005). Reforçando nossos achados, outros observaram que o tratamento sistêmico de camundongos com o doador de H₂S (NaHS) *per se* aumentou de maneira dependente da dose a atividade da MPO no pulmão de camundongos, acompanhado de elevação dos níveis plasmáticos de substância P (Bhatia et al., 2006). De forma semelhante, Li et al. (2005), com intuito de avaliar

diretamente o papel do H_2S na inflamação, observaram que a administração sistêmica de NaHS *per se* causou aumento da atividade da MPO no fígado e pulmão, além de elevar a concentração de $TNF-\alpha$ plasmático em camundongos, sugerindo um efeito deletério para o H_2S . Essas discrepâncias podem estar também associadas ao tipo de tecido e concentração de H_2S no local. De fato, no estudo de Li et al. (2005), utilizou-se a dose de 14 $\mu\text{mol/kg}$, enquanto o estudo de Bhatia et al. (2006), administrou-se a dose de 10 mg/kg, correspondente a 178 $\mu\text{mol/kg}$. Doses inferiores, correspondentes a 17,5 e 89 $\mu\text{mol/kg}$, não induziram aumento significativo da atividade da MPO. Reforçando a sugestão de que o efeito do H_2S está intimamente relacionado à dose e/ou local (tecido específico), Fiorucci et al. (2005), utilizando a dose de NaHS (100 $\mu\text{mol/kg}$; i.p.), observaram redução significativa do aumento da atividade da MPO induzida pela lesão gástrica (úlceras) causada por AINES, como a aspirina e indometacina em ratos. No conjunto, esses trabalhos mostram e reforçam a existência de uma estreita relação entre a dosagem administrada dos doadores de H_2S (biodisponibilidade desse gás) e o efeito benéfico ou maléfico obtido em cada tecido, órgão ou sistema.

Postula-se que alguns dos mecanismos pelos quais o H_2S exerce seus efeitos está associado à ativação de canais de K_{ATP} , regulação da síntese de citocinas e de moléculas de adesão. As moléculas de adesão são importantes componentes no processo de rolamento, adesão e migração de leucócitos para um sítio de lesão tecidual (Carlos e Harlan, 1994; Petri et al., 2008). Nesse sentido, Sidhapuriwala et al. (2009) demonstraram que o pré-tratamento de camundongos com NaHS reduziu as concentrações das moléculas de adesão P-selectina, E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 no pâncreas de animais com pancreatite induzida por ceruleína.

Embora essas moléculas não foram avaliadas na pele dos animais deste estudo, esta é uma opção atraente para explicar o mecanismo de inibição da atividade da MPO na pele dos animais injetados com C48/80 e co-tratados com os doadores de H_2S . Assim, as análises em andamento sobre o perfil histológico, níveis de moléculas de adesão, entre outras abordagens metodológicas, poderão fornecer melhores subsídios para explicar o efeito inibitório dos agentes doadores de H_2S no prurido e inflamação cutânea evocada pela histamina e C48/80.

Acreditando na relevância do H_2S no controle do fenômeno de coceira e inflamação cutânea induzida pela histamina e / ou C48/80, avaliou-se a seguir a expressão das enzimas envolvidas na síntese endógena do H_2S . No que tange à geração endógena de H_2S , dados da literatura mostram que esta ocorre fisiologicamente em condições normais em diversos tecidos e órgãos de mamíferos, incluindo o cérebro (Abe e Kimura, 1996), pâncreas (Bhatia et al., 2005b), fígado (Collin et al., 2005), cólon e medula espinhal (Distrutti et al., 2006), aorta, íleo (Zhao et al., 2001) pulmão, rim e coração (Doeller et al., 2005) via reação catalisada pelo metabolismo da L-cisteína, por ação de enzimas dependentes do 5'-fosfato de piridoxal CSE e CBS (Stipanuk e Beck, 1982).

Porém, cabe acrescentar que nenhum trabalho demonstrou ou quantificou concentrações de H_2S ou a expressão das enzimas CBS e CSE na pele em condições fisiológicas ou patológicas. Assim, os ensaios *in vitro* (Western blot) na pele de camundongos BALB/c deste estudo mostram e afirmam, pela primeira vez, que tanto a enzima CBS quanto a CSE estão expressas constitutivamente no tecido cutâneo desses animais. Como controle positivo, as amostras de cérebro revelaram bandas imunorreativas para os pesos moleculares compatíveis com as enzimas CBS e CSE. No caso do cérebro, observou-se que a banda imunorreativa para CBS apresentou maior intensidade em relação à CSE, confirmando assim os dados de literatura que mostram maior expressão dessa enzima no sistema nervoso central (Stipanuk e Beck, 1982; Zhao et al., 2001).

Admitindo ser válido o conhecimento atual da expressão constitutiva das isoformas CSE e CBS na pele naïve de camundongos, avaliou-se adiante a geração de H_2S . O ensaio de cinética da síntese de H_2S confirmou a atividade dessas enzimas na pele, indicando que ambas isoformas participam da geração de H_2S local, visto que inibidores específicos de cada isoforma reduziram a geração desse gás. Cabe ressaltar que a inibição da isoforma CBS, pelo CHH, foi mais eficiente quando comparado à inibição da CSE pela PGly. Estes dados são curiosos, uma vez que contradizem achados da literatura, os quais mostram uma maior expressão da CBS no sistema nervoso central, enquanto a CSE é expressa, principalmente, na periferia (Stipanuk e Beck, 1982; Zhao et al., 2001). Vale lembrar que a pele é inervada por uma ampla rede neuronal e, portanto, a geração de H_2S no sistema nervoso

periférico pela CBS é uma hipótese que não pode ser descartada. Ainda, seria conveniente analisar em estudos futuros a exata localização ou co-localização dessas enzimas nas células do tecido cutâneo.

Por fim, em relação à análise da expressão protéica (Western blot) das enzimas CBS e CSE na pele inflamada dos animais, verificou-se que essas não foram afetadas. Com base nesses resultados, conclui-se que, independentemente da ação inflamatória e pruriginosa causada pela injeção i.d. do C48/80 na pele dos animais, a produção endógena de H_2S na pele por ação enzimática das enzimas CBS e CSE não parece ser afetada. Para uma melhor compreensão desses resultados, entende-se ser conveniente analisar em estudos subsequentes a localização e co-localização dessas enzimas no tecido cutâneo.

Em suma, a presente investigação, além de demonstrar, pela primeira vez, que a suplementação de H_2S , por intermédio de doadores desse gás, inibe o comportamento de coceira induzido por histamina, e alguns dos sinais da inflamação (extravasamento plasmático e aumento da atividade de MPO) cutânea frente à histamina e C48/80 em pele de camundongos, fornece ainda dados inéditos da geração local do H_2S via ação enzimática da CSE e CBS, ambas constitutivamente expressas na pele desses animais.

5 CONCLUSÕES

- A injeção i.d. de histamina ou C48/80 induz aumento significativo da frequência de coceira, além de promover inflamação local, caracterizada por extravasamento plasmático e aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO; indicativo de influxo de neutrófilos) na pele de camundongos BALB/c;
- O tratamento (coinjeção) na pele com o Na₂S (1 – 100 nmol/sítio) ou LR (3 – 300 nmol/sítio) reduz significativamente a inflamação cutânea evocada por histamina ou C48/80, mas somente inibiu significativamente o prurido induzido por histamina;
- Os ensaios de Western blot e cinética de geração de H₂S revelaram, pela primeira vez, a expressão constitutiva das enzimas CSE e CBS e a geração local de H₂S na pele naïve de camundongos BALB/c. A inflamação cutânea não afetou a expressão dessas enzimas.
- Conclui-se que, as enzimas CBS e CSE estão expressas constitutivamente na pele de camundongos BALB/c, e que o aumento na biodisponibilidade do H₂S local, via emprego de doadores desse gás, exerce efeitos protetores, capazes de inibir o prurido induzido por histamina e a inflamação cutânea frente à histamina ou C48/80;
- Este estudo leva à sugestão que doadores de H₂S representam um potencial terapêutico para o tratamento do prurido e inflamação cutânea.

REFERÊNCIAS*

- Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996;16(3):1066-71.
- Andruski B, McCafferty DM, Ignacy T, Millen B, McDougall JJ. Leukocyte trafficking and pain behavioral responses to a hydrogen sulfide donor in acute monoarthritis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(3):R814-20.
- 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.
- 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.
- Belardinelli MC, Chabli A, Chadeaux-Vekemans B, Kamoun P. Urinary sulfú compounds in Down syndrome. *Clin Chem*. 2001;47(8):1500-1.
- Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moolhalla SM, Moore PK. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacol*. 2005a;145(2):141-4.
- Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moolhalla SM, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J*. 2005b;19(6):623-5.
- Bhatia M, Zhi L, Zhang H, Ng SW, Moore PK. Role of substance P in hydrogen sulfide-induced pulmonary inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(5):L896-904.
- 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.
- Boulaís N, Misery L. The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol*. 2008;18(2):119-27.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982;78(3):206-9.
- Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol*. 1985;86(4):855-60.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007May 22]

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994; 84(7):2068-101.

Chen YH, Wu R, Geng B, Qi YF, Wang PP, Yao WZ, Tang CS. Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. *Cytokine*. 2009;45(2):117-23.

Church MK, Levi-Schaffer F. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99(2):155-60.

Collin M, Anuar FB, Murch O, Bhatia M, Moore PK, Thiernemann C. Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol*. 2005;146(4):498-505.

Costa R, Marotta DM, Manjavachi MN, Fernandes ES, Lima-Garcia JF, Paszcuk AF, Quintão NL, Juliano L, Brain SD, Calixto JB. Evidence for the role of neurogenic inflammation components in trypsin-elicited scratching behaviour in mice. *Br J Pharmacol*. 2008 Jul;154(5):1094-103.

Costa SK, Starr A, Hyslop S, Gilmore D, Brain SD. How important are NK1 receptors for influencing microvascular inflammation and itch in the skin? Studies using *Phoneutria nigriventer* venom. *Vascul Pharmacol*. 2006;45(4):209-14.

Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WA Jr, Guerrero AT, Souza GR, Vieira SM, Lotufo CM, Neto AF, Ferreira SH, Cunha FQ. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *Eur J Pharmacol*. 2008;590(1-3):127-35.

Davidson S, Zhang X, Yoon CH, Khasabov SG, Simone DA, Giesler GJ Jr. The itch-producing agents histamine and cowhage activate separate populations of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurosci*. 2007;27(37):10007-14.

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

de Vasconcelos DI, Leite JA, Carneiro LT, Piuvezam MR, de Lima MR, de Moraes LC, Rumjanek VM, Rodrigues-Mascarenhas S. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:912925.

Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Russo G, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S. 5-Amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3-yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(1):447-58.

Distrutti E, Cipriani S, Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, Cianetti S, Fiorucci S. Hydrogen sulphide induces micro opioid receptor-dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. *Mol Pain*. 2010;6:36.

Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel RP, Lancaster JR Jr, Darley-USmar VM, Kraus DW. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal Biochem.* 2005;341(1):40-51.

Drzezga A, Darsow U, Treede RD, Siebner H, Frisch M, Munz F, Weilke F, Ring J, Schwaiger M, Bartenstein P. Central activation by histamine-induced itch: analogies to pain processing: a correlational analysis of O-15 H₂O positron emission tomography studies. *Pain.* 2001;92(1-2):295-305.

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.

Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(39):15560-5.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. 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.

Ferreira T, Camargo EA, Ribela MT, Damico DC, Marangoni S, Antunes E, De Nucci G, Landucci EC. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. *Toxicon.* 2009;53(1):69-77.

Ferry X, Brehin S, Kamel R, Landry Y. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. *Peptides.* 2002;23(8):1507-15

Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A, Cirino G, Wallace JL. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology.* 2005;129(4):1210-24.

Fiorucci S, Santucci L, Distrutti E. NSAIDs, coxibs, CINOD and H₂S-releasing NSAIDs: what lies beyond the horizon. *Dig Liver Dis.* 2007;39(12):1043-51.

Fjellner B, Hägermark O. Influence of ultraviolet light on itch and flare reactions in human skin induced by histamine and the histamine liberator compound 48/80. *Acta Derm Venereol.* 1982;62(2):137-40.

Friedrich G, Haas R, Metz G. Inhibitory effect of clobazepam on compound 48/80-induced histamine and serotonin release from rat mast cells. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1984;267(2):264-8.

Greaves MW, Wall PD. Pathophysiology of itching. *Lancet*. 1996;348(9032):938-40.

Hägermark O, Strandberg K, Grönneberg R. Effects of histamine receptor antagonists on histamine-induced responses in human skin. *Acta Derm Venereol*. 1979;59(4):297-300.

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.

Hegde A, Bhatia M. Hydrogen sulfide in inflammation: friend or foe? *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011;10(2):118-22.

Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*. 1997;49(3):253-78.

Hino RH, Lau CK, Read GW. The site of action of the histamine releaser compound 48/80 in causing mast cell degranulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1977;200(3):658-63.

Hosogi M, Schmelz M, Miyachi Y, Ikoma A. Bradykinin is a potent pruritogen in atopic dermatitis: a switch from pain to itch. *Pain*. 2006 Dec 15;126(1-3):16-23. from pain to itch. *Pain*. 2006;126(1-3):16-23.

Hossen MA, Inoue T, Shinmei Y, Minami K, Fujii Y, Kamei C. Caffeic acid inhibits compound 48/80-induced allergic symptoms in mice. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(1):64-6.

Ikoma A, Handwerker H, Miyachi Y, Schmelz M. Electrically evoked itch in humans. *Pain*. 2005;113(1-2):148-54.

Inagaki N, Igeta K, Kim JF, Nagao M, Shiraishi N, Nakamura N, Nagai H. Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80. *Eur J Pharmacol*. 2002;448(2-3):175-83.

Jeffery J, Kim S, Chen ZF. Itch signaling in the nervous system. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(4):286-92.

Ji Y, Pang QF, Xu G, Wang L, Wang JK, Zeng YM. Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 2008;587(1-3):1-7.

Jinks SL, Carstens E. Superficial dorsal horn neurons identified by intracutaneous histamine: chemonociceptive responses and modulation by morphine. *J Neurophysiol*. 2000;84(2):616-27.

Johanek LM, Meyer RA, Hartke T, Hobelmann JG, Maine DN, LaMotte RH, Ringkamp M. Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch. *J Neurosci*. 2007;27(28):7490-7.

Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. Exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of KATP channels. *Basic Res Cardiol*. 2006;101(1):53-60.

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, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, Sekiguchi F, Wada T, Ichida S, Nishikawa H. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain*. 2007 Nov;132(1-2):74-81.

Kim HM, Shin HY, Choo YK, Park JK. Inhibition of mast cell-dependent anaphylaxis by sodium salicylate. *Immunology*. 1999 ;96(4):551-6

Kim BM, Lee SH, Shim WS, Oh U. Histamine-induced Ca(2+) influx via the PLA(2)/lipoygenase/TRPV1 pathway in rat sensory neurons. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):159-62.

Kim DK, Kim HJ, Kim H, Koh JY, Kim KM, Noh MS, Kim JJ, Lee CH. Involvement of serotonin receptors 5-HT₁ and 5-HT₂ in 12(S)-HPETE-induced scratching in mice. *Eur J Pharmacol*. 2008;579(1-3):390-4.

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

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

Lagunoff D, Martin TW, Read G. Agents that release histamine from mast cells *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1983;23:331-51

Lee AT, Shah JJ, Li L, Cheng Y, Moore PK, Khanna S. A nociceptive-intensity-dependent role for hydrogen sulphide in the formalin model of persistent inflammatory pain. *Neuroscience*. 2008;152(1):89-96.

Lee HS, Lee CH, Tsai HC, Salter DM. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulfide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1 β . *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Jan;17(1):91-9.

Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J*. 2005;19(9):1196-8.

Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee LC, Del Soldato P, Moore PK. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radic Biol Med*. 2007 ;42(5):706-19.

Linardi A, Costa SK, da Silva GR, Antunes E. Involvement of kinins, mast cells and sensory neurons in the plasma exudation and paw oedema induced by staphylococcal enterotoxin B in the mouse. *Eur J Pharmacol*. 2000;399(2-3):235-42.

Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;81(3):590-7.

Maeda Y, Aoki Y, Sekiguchi F, Matsunami M, Takahashi T, Nishikawa H, Kawabata A. Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: evidence for involvement of Cav3.2 T-type calcium channels. *Pain*. 2009;142(1-2):127-32.

McGlone F, Reilly D. The cutaneous sensory system. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;34(2):148-59.

Mochizuki H, Tashiro M, Kano M, Sakurada Y, Itoh M, Yanai K. Imaging of central itch modulation in the human brain using positron emission tomography. *Pain*. 2003;105(1-2):339-46.

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.

Nicolson TA, Bevan S, Richards CD. Characterisation of the calcium responses to histamine in capsaicin-sensitive and capsaicin-insensitive sensory neurones. *Neuroscience*. 2002;110(2):329-38.

Nigam R, El-Nour H, Amatya B, Nordlind K. GABA and GABA(A) receptor expression on immune cells in psoriasis: a pathophysiological role. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(7):507-15.

Nishimura S, Fukushima O, Ishikura H, Takahashi T, Matsunami M, Tsujiuchi T, Sekiguchi F, Naruse M, Kamanaka Y, Kawabata A. Hydrogen sulfide as a novel mediator for pancreatic pain in rodents. *Gut*. 2009;58(6):762-70.

Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem*. 2000;275(47):36781-6

Ohta Y, Kobayashi T, Inui K, Yoshino J, Nakazawa S. Protective effect of ebselen, a seleno-organic compound, against the progression of acute gastric mucosal lesions induced by compound 48/80, a mast cell degranulator, in rats. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 90(4):295-303.

Ohta Y, Kongo M, Kishikawa T. Preventive effect of melatonin on the progression of alpha-naphthylisothiocyanate-induced acute liver injury in rats. *J Pineal Res.* 2003;34(3):185-93.

Okubo K, Takahashi T, Sekiguchi F, Kanaoka D, Matsunami M, Ohkubo T, Yamazaki J, Fukushima N, Yoshida S, Kawabata A. Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience.* 2011;188:148-56.

Owen DA, Poy E, Woodward DF, Daniel D. Evaluation of the role of Histamine H1-and H2-receptors in cutaneous inflammation in the guinea-pig produced by histamine and mast cell degranulation. *Br J Pharmacol.* 1980;69(4):615-23.

Ozaki K, Matsuura T, Narama I. Characterization of spontaneous dermatitis in beige rats with IgE hyperproduction. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;136(1):73-82.

Pae HO, Lee YC, Jo EK, Chung HT. Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H₂S) in inflammation. *Arch Pharm Res.* 2009;32(8):1155-62.

Palframan RT, Costa SK, Wilsoncroft P, Antunes E, de Nucci G, Brain SD. The effect of a tachykinin NK1 receptor antagonist, SR140333, on oedema formation induced in rat skin by venom from the *Phoneutria nigriventer* spider. *Br J Pharmacol.* 1996;118(2):295-8.

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

Paton WD. Compound 48/80: a potent histamine liberator. *Br J Pharmacol Chemother.* 1951; 6(3):499-508.

Pettigrew HD, Teuber SS, Kong JS, Gershwin ME. Contemporary challenges in mastocytosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;38(2-3):125-34.

Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol.* 2008;180(10):6439-46.

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.

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.

Rosbach K, Nassenstein C, Gschwandtner M, Schnell D, Sander K, Seifert R, Stark H, Kietzmann M, Bäumer W. Histamine H₁, H₃ and H₄ receptors are involved in pruritus. *Neuroscience*. 2011;190:89-102.

Rukwied R, Lischetzki G, McGlone F, Heyer G, Schmelz M. Mast cell mediators other than histamine induce pruritus in atopic dermatitis patients: a dermal microdialysis study. *Br J Dermatol*. 2000;142(6):1114-20.

Savin JA. How should we define itching ? *J Am Acad Dermatol*. 1998;39(2 Pt1):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, Schmid R, Handwerker HO, Torebjörk HE. Encoding of burning pain from capsaicin-treated human skin in two categories of unmyelinated nerve fibres. *Brain*. 2000a;123 Pt 3:560-71.

Schmelz M, Michael K, Weidner C, Schmidt R, Torebjörk HE, Handwerker HO. Which nerve fibers mediate the axon reflex flare in human skin? *Neuroreport*. 2000b;11(3):645-8.

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 and pain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;34(2):171-6.

Schmidt R, Schmelz M, Ringkamp M, Handwerker HO, Torebjörk HE. Innervation territories of mechanically activated C nociceptor units in human skin. *J Neurophysiol*. 1997;78(5):2641-8.

Sidhapuriwala J, Li L, Sparatore A, Bhatia M, Moore PK. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative, on carrageenan-induced hindpaw oedema formation in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2007;569(1-2):149-54.

Sidhapuriwala JN, Ng SW, Bhatia M. Effects of hydrogen sulfide on inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *J Inflamm (Lond)*. 2009;6:35.

Simons FE, Simons KJ, Becker AB, Haydey RP. Pharmacokinetics and antipruritic effects of hydroxyzine in children with atopic dermatitis. *J Pediatr*. 1984;104(1):123-7.

Shim WS, Tak MH, Lee MH, Kim M, Kim M, Koo JY, Lee CH, Kim M, Oh U. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *J Neurosci*. 2007;27(9):2331-7.

Smith HS. Hydrogen sulfide's involvement in modulating nociception. *Pain Physician*. 2009;12(5):901-10.

Spiller F, Orrico MI, Nascimento DC, Czaikoski PG, Souto FO, Alves-Filho JC, Freitas A, Carlos D, Montenegro MF, Neto AF, Ferreira SH, Rossi MA, Hothersall JS, Assreuy J, Cunha FQ. 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, Schmelz M. Chronic itch and pain--similarities and differences. *Eur J Pain*. 2006;10(5):473-8.

Ständer S, Weisshaar E, Mettang T, Szepletowski JC, Carstens E, Ikoma A, Bergasa NV, Gieler U, Misery L, Wallengren J, Darsow U, Streit M, Metze D, Luger TA, Greaves MW, Schmelz M, Yosipovitch G, Bernhard JD. Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch. *Acta Derm Venereol*. 2007;87(4):291-4.

Ständer S, Weisshaar E, Luger TA. Neurophysiological and neurochemical basis of modern pruritus treatment. *Exp Dermatol*. 2008;17(3):161-9.

Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Skov PS, Luger TA, Schmelz M. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci*. 2003;23(15):6176-80.

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.

Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydratation in liver and kidney of the rat. *Biochem J*. 1982;206(2):267-77.

Sugimoto Y, Umakoshi K, Nojiri N, Kamei C. Effects of histamine H₁ receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. *Eur J Pharmacol*. 1998;351(1):1-5.

Suh WM, Park SB, Lee S, Kim HH, Suk K, Son JH, Kwon TK, Choi HG, Lee SH, Kim SH. Suppression of mast-cell-mediated allergic inflammation by *Lindera obtusiloba*. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(2):240-6.

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

Sun YG, Zhao ZQ, Meng XL, Yin J, Liu XY, Chen ZF. Cellular basis of itch sensation. *Science*. 2009;325(5947):1531-4.

Suwa E, Yamaura K, Oda M, Namiki T, Ueno K. Histamine H₄ receptor antagonist reduces dermal inflammation and pruritus in a hapten-induced experimental model. *Eur J Pharmacol*. 2011;667(1-3):383-8.

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

Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P, Harrison S. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br J Pharmacol.* 2005; 145(8):1123-31.

Tsuji 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. Itch evoked by electrical stimulation of the skin. *J Invest Dermatol.* 1982 ;79(6):368-73.

Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, Jones EA, Libretto SE, Szepietowski JC, Zylicz Z. Itch: scratching more than the surface. *QJM.* 2003;96(1):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.

von Frey, M. Zur Physiologie der Juckempfindung. *Arch. Neerland Physiol.* 1922; 7, 142–145.

Wallace JL. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(10):501-5.

Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dicay M, Martin GR. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology.* 2009;137(2):569-78,

Wahlgren CF. Measurement of itch. *Semin Dermatol.* 1995;14(4):277-84

Wallengren J. Neuroanatomy and neurophysiology of itch. *Dermatol Ther.* 2005;18(4):292-303.

Ward L, Wright E, McMahon SB. A comparison of the effects of noxious and innocuous counterstimuli on experimentally induced itch and pain. *Pain.* 1996;64(1):129-38.

Weisshaar E, Ziethen B, Gollnick H. Can a serotonin type 3 (5-HT₃) receptor antagonist reduce experimentally-induced itch? *Inflamm Res.* 1997;46(10):412-6.

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(10):1147-54.

Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2011;4(1):13-32.

Whiteman M, Le Trionnaire S, Chopra M, Fox B, Whatmore J. Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121(11):459-88.

Williams TJ, Brain SD, Hellewell PG, Jose PJ, Nourshargh S, Rampart M. Alteration in microvascular permeability induced by products released during inflammation. *Prog Clin Biol Res*. 1988;263:55-69.

Woo DH, Jung SJ, Zhu MH, Park CK, Kim YH, Oh SB, Lee CJ. Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol Pain*. 2008;4:42.

Yamaguchi T, Nagasawa T, Satoh M, Kuraishi Y. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice. *Neurosci Res*. 1999;35(2):77-83.

Yamaura K, Oda M, Suwa E, Suzuki M, Sato H, Ueno K. Expression of histamine H₄ receptor in human epidermal tissues and attenuation of experimental pruritus using H₄ receptor antagonist. *J Toxicol Sci*. 2009;34(4):427-31.

Yosipovitch G, Greaves MW, Schmelz M. Itch. *Lancet*. 2003;361(9358):690-4.

Yshii LM, Souza GH, Camargo EA, Eberlin MN, Ribela MT, Muscará MN, Hyslop S, Costa SK. Characterization of the mechanisms underlying the inflammatory response to *Polistes lanio lanio* (paper wasp) venom in mouse dorsal skin. *Toxicon*. 2009;53(1):42-52.

Zanardo RC, Brancalone 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 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.

Zhang H, Zhi L, Moore PK, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(6):L1193-201.

Zhang J, Sio SW, Mochhala S, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Mol Med*. 2010;16(9-10):417-24.