

**SILVIA ABIGAIL COAVOY SÁNCHEZ**

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

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão original

São Paulo  
2016

## RESUMO

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

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

**Palavras-chave:** Prurido. Receptor ativado por protease-2 (PAR-2). SLIGRL-NH<sub>2</sub>. Sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). Camundongo.

## ABSTRACT

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

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

**Keywords:** Pruritus. Protease-activated receptor 2 (PAR-2). SLIGRL-NH<sub>2</sub>. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). Mice.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Bases neurofisiológicas do prurido

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

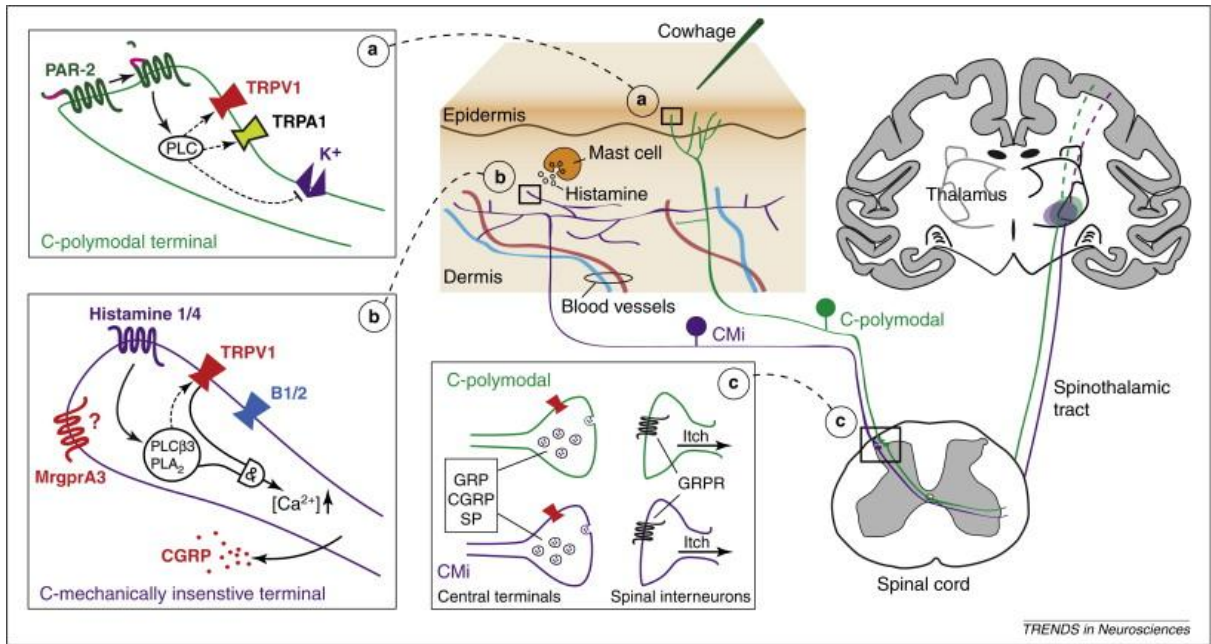
A sensação de coceira, assim como a sensação de dor, é iniciada nos neurônios aferentes primários pruriceptivos que transmitem a informação da periferia até o sistema nervoso central (Ikoma et al., 2006). Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários situam-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG)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

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

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

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





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

Fonte: Davidson e Giesler, 2010.

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

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

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

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

(h) humanos; (c) camundongos.

Fonte: Adaptada de Bautista et al., 2014.

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

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

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

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

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

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

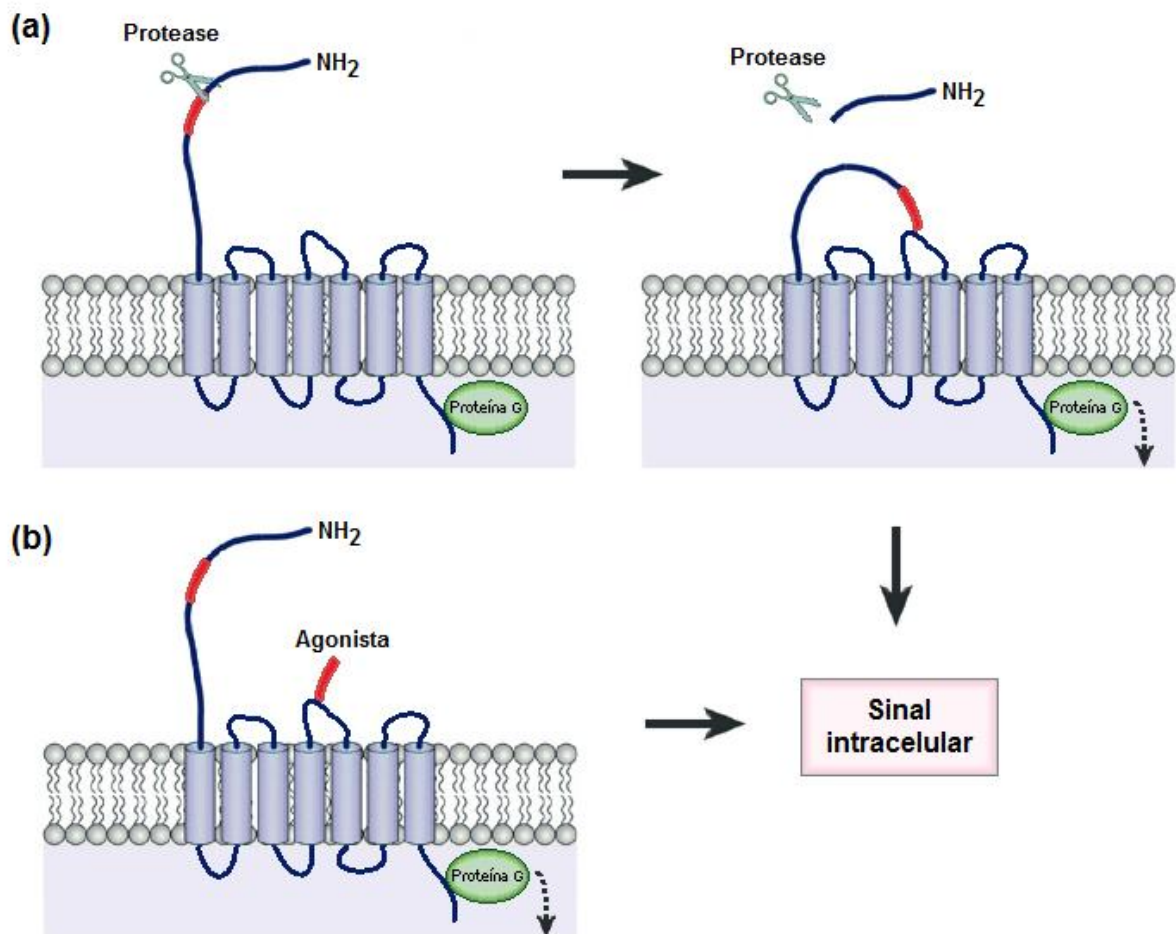
Em síntese, a sensação de coceira é produzida quando diversos pruritógenos exógenos ou endógenos estimulam os receptores presentes nas fibras nervosas sensoriais da pele e ativam as vias periféricas da coceira; isso provoca uma cascata de sinalização e de potenciais de ação nos neurônios aferentes primários,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

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

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

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

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



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

Fonte: Adaptada de Guenther e Melzig, 2015.

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

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

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

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

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

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

A ativação do PAR-2 está ligada à ativação da proteína G acoplada ( $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$  e  $G\alpha_{12/13}$ ), induzindo a ativação das respectivas vias de sinalização intracelular.  $G\alpha_q$  conduz ao incremento dos níveis intracelulares de cálcio  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $G\alpha_i$  inibe a via adenilato ciclase-cAMP-MAPK e  $G\alpha_{12/13}$  medeia o incremento da atividade de Rho-quinase (Zhao et al., 2014a). Os peptídeos agonistas SLIGRL-NH<sub>2</sub> e SLIGKV-NH<sub>2</sub> ativam a via da proteína  $G\alpha_q$ , que envolve a ativação da fosfolipase C que, por sua vez, gera diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) a partir da hidrólise de

fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) os quais induzem à mobilização de cálcio intracelular e, por outra parte, à ativação da proteína quinase C (PKC; Adams et al., 2011; Zhao et al., 2014a).

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

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



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

A ativação do PAR-2 em queratinócitos induz a liberação de leucotrieno B4 (LTB4) que provoca coceira através da ativação dos receptores BLT-1 (receptor para LB4) expressos nas fibras nervosas sensoriais (Akiyama et al., 2015). A ativação do PAR-2 em queratinócitos também induz a liberação de linfopoietina estromal tímica (TSLP), uma citocina que excita os neurônios sensoriais que coexpressam o receptor para TSLP e TRPA1, para provocar coceira (Wilson et al., 2013b).

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

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

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

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

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

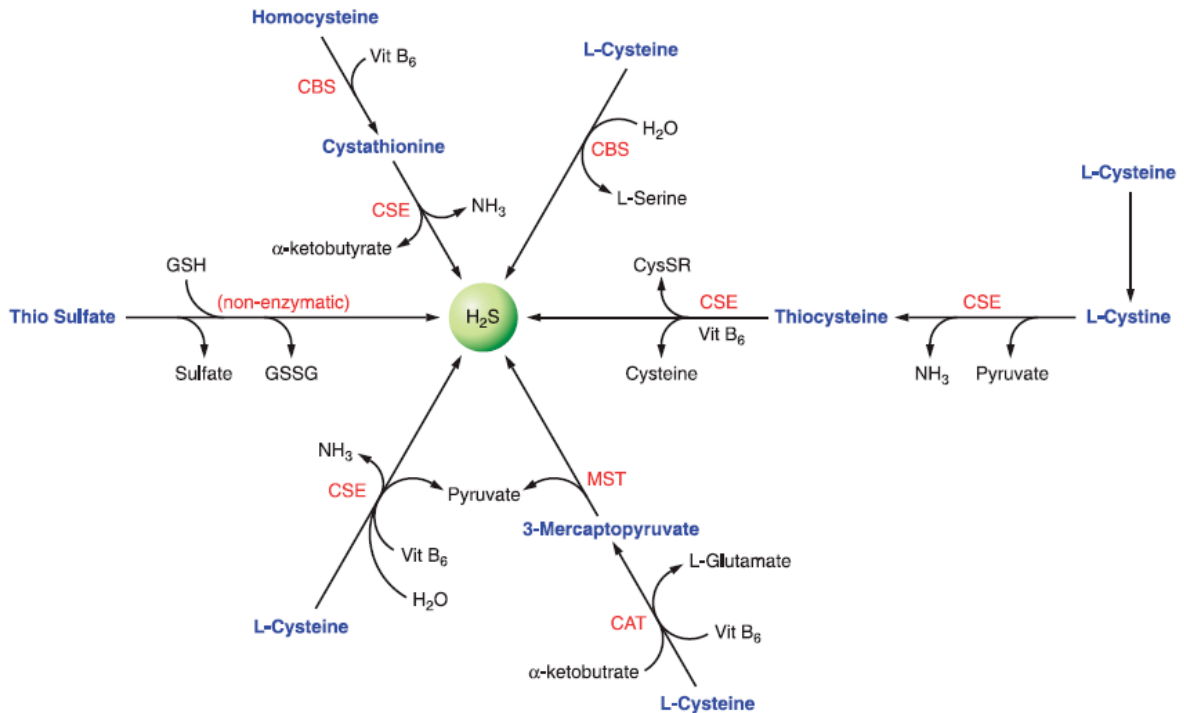
### 1.3 Função biológica do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)

O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é um gás incolor, inflamável, solúvel em água com o cheiro característico de ovo podre. Durante várias décadas o H<sub>2</sub>S recebeu muita atenção por ser um gás altamente tóxico e assim, como um perigoso contaminante ambiental (Beauchamp et al., 1984). Entretanto, estudos mais recentes mostram que o H<sub>2</sub>S também é produzido endogenamente durante o metabolismo da cisteína em mamíferos (Abe, Kimura, 1996; Kamoun, 2004). Semelhante ao óxido nítrico (NO) e ao monóxido de carbono (CO), o H<sub>2</sub>S funciona como um gasotransmissor que participa no controle de muitas funções celulares interferindo em processos de sinalização celular (Li et al., 2011).

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

A produção endógena de H<sub>2</sub>S em mamíferos é principalmente através de vias enzimáticas responsáveis da metabolização do aminoácido L-cisteína (Figura 3), sendo as principais duas enzimas dependentes de piridoxal-5'-fosfato (vitamina B<sub>6</sub>), as enzimas cistationina β-sintase (CBS) e cistationina γ-liase (CSE). A CBS utiliza L-cisteína para produzir H<sub>2</sub>S e L-serina, enquanto a CSE forma H<sub>2</sub>S, piruvato e amônia diretamente a partir de L-cisteína ou a partir de L-cistina, sendo a tiocisteína um intermediário no processo. Uma terceira via enzimática para a produção de H<sub>2</sub>S é a via catalisada pela 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST) / aminotransferase (CAT). O 3MST produz H<sub>2</sub>S a partir de 3-mercaptopiruvato (3MP) que é gerado pela CAT a partir de L-cisteína e α-cetoácidos (α-cetobutirato ou α-cetoglutarato) na presença de tiol e agentes redutores (Li et al., 2011; Shibuya et al., 2013; Wang, 2012). O substrato L-cisteína pode ser derivado de fontes alimentares ou liberado de proteínas endógenas, mas também pode ser sintetizado endogenamente a partir da L-metionina por trans-sulfuração, sendo a homocisteína e a cistationina intermediários no processo (Szabó, 2007). Todas as enzimas estão expressas de forma ampla em vários tecidos, no entanto, a via da CBS contribui principalmente para a produção de H<sub>2</sub>S endógeno no sistema nervoso central. A CSE é uma das principais enzimas produtoras de H<sub>2</sub>S no sistema cardiovascular e o sistema 3MST/CAT no miocárdio (Olas, 2014). Recentemente foi encontrada em roedores uma nova via para a produção endógena de H<sub>2</sub>S, a qual usa como substrato o aminoácido D-cisteína envolvendo as enzimas D-amino-oxidase e 3MST (Shibuya et al., 2013).

Além das vias enzimáticas, a produção endógena de H<sub>2</sub>S pode ocorrer também via processos não enzimáticos que são menos conhecidos, envolvendo a participação de glicose, glutathione, polissulfuretos orgânicos e inorgânicos e enxofre elementar. Nos eritrócitos, o H<sub>2</sub>S pode ser gerado a partir da glicose (via glicólise) ou de fosfogluconato (via NADPH oxidase). Assim, a glicose reage com a metionina, homocisteína e cisteína para produzir os compostos H<sub>2</sub>S e metanotiol. O H<sub>2</sub>S também é produzido pela redução direta de glutathione e enxofre elementar. A redução do enxofre elementar para H<sub>2</sub>S é envolve NADH ou NADPH. A formação de H<sub>2</sub>S a partir de tiosulfato ocorre via uma reação redutora que envolve piruvato, o qual atua como doador de hidrogênio (Kolluru et al., 2013).



**Figura 3** - Biossíntese de  $H_2S$  em mamíferos. CBS, cistationina  $\beta$ -sintase; CSE, cistationina  $\gamma$ -liase; MST, 3-mercaptopiruvato sulfutransferase; CAT, cisteína aminotransferase.

Fonte: Wang, 2012.

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

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

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

al., 2014; Kram et al., 2013; Zagli et al., 2007), anticancerígeno (Lee et al., 2011), na redução do estresse oxidativo (Yan et al., 2006; Yonezawa et al., 2007), neuromodulação (Abe, Kimura, 1996), vasorregulação (Laggner et al., 2007; Zhao et al., 2001), proteção contra a lesão de reperfusão pós-infarto do miocárdio (Sivarajah et al., 2009), inibição da resistência à insulina (Ali et al., 2007), dentre outras. Um estudo feito por nosso grupo (Rodrigues, 2012) sugere um novo papel fisiológico e terapêutico do H<sub>2</sub>S ao mostrar que a injeção intradérmica de doadores de H<sub>2</sub>S reduz o prurido e a inflamação decorrentes da administração de histamina ou o composto 48/80 (um indutor da degranulação de mastócitos) na pele de camundongos.

No entanto, o papel dos doadores de H<sub>2</sub>S é controverso em algumas funções como na inflamação, sendo que alguns estudos mostram que o H<sub>2</sub>S desempenha um papel pró-inflamatório (Dal-Secco et al., 2008; Spiller et al., 2010), ao passo que outros estudos demonstram que o H<sub>2</sub>S tem efeitos anti-inflamatórios (Ekundi-Valentim et al., 2010; Mesquita, 2013; Zanardo et al., 2006). Estes resultados díspares podem ser devidos os diversos doadores de H<sub>2</sub>S utilizados nas pesquisas; ademais, não está claro se os subprodutos que poderiam se formar juntamente com a geração de H<sub>2</sub>S têm efeitos biológicos (Zhao et al., 2014b).

Os mecanismos farmacológicos pelos quais o H<sub>2</sub>S exerce seus efeitos não foram totalmente elucidados. Estudos com canais iônicos vêm demonstrando que o H<sub>2</sub>S, tanto endógeno quanto exógeno, é capaz de ativar os canais de potássio dependentes de ATP (K<sub>ATP</sub>), resultando em hiperpolarização, o que no músculo liso vascular manifesta-se como vasodilatação (Zhao et al., 2001). A modulação de outros tipos de canais como os de Ca<sup>2+</sup> tipo-T e tipo-L, canais de Na<sup>+</sup>, canais de Cl<sup>-</sup> e a ativação de receptores como TRPV1 e TRPA1, também foram demonstrados como possíveis mecanismos de ação do H<sub>2</sub>S (Guo et al., 2013; Li et al., 2011; Streng et al., 2008). O H<sub>2</sub>S é capaz de reduzir a produção ou expressão de vários mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS), bem como inibir a ativação de NF-kB em plasma (Li et al., 2009). H<sub>2</sub>S também tem um papel regulatório no metabolismo do óxido nítrico (Kolluru et al., 2013). O H<sub>2</sub>S provoca S-sulfidração de um grande número de proteínas celulares um processo potencialmente importante pelo qual o H<sub>2</sub>S pode alterar as funções de uma ampla gama de proteínas celulares e enzimas (Mustafa et al., 2009).

Com base nos mecanismos e velocidade de liberação de H<sub>2</sub>S, os doadores de H<sub>2</sub>S podem ser divididos em três grupos: 1) substâncias inorgânicas ou sais de

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

Tendo em consideração o potencial terapêutico e o conhecimento limitado sobre os mecanismos de ação dos compostos doadores de H<sub>2</sub>S no tratamento do prurido, a execução do presente projeto procura aprofundar a compreensão da farmacologia destes compostos.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados mostrados, podemos concluir que:

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

## REFERÊNCIAS\*

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

---

\* De acordo com:

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bell JK, McQueen DS, Rees JL. Involvement of histamine H<sub>4</sub> and H<sub>1</sub> receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice. *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):374-80.

Bíró T, Tóth BI, Marincsák R, Dobrosi N, Géczy T, Paus R. TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(8):1004-21.

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

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

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

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

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

Calixto JB, Kassuya CA, André E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther.* 2005;106(2):179-208.

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

Cavanaugh EJ, Simkin D, Kim D. Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca<sup>2+</sup> reveals different functional channel states. *Neuroscience.* 2008;154(4):1467-76.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Filipovic MR, Eberhardt M, Prokopovic V, et al. Beyond H<sub>2</sub>S and NO interplay: hydrogen sulfide and nitroprusside react directly to give nitroxyl (HNO). A new pharmacological source of HNO. *J Med Chem.* 2013;56(4):1499-508.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H<sub>2</sub>S-induced activation of KATP channels. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:1167-78.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci*. 2009;29(15):4808-19.
- Lagerström MC, Rogoz K, Abrahamsen B, et al. VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch. *Neuron*. 2010;68(3):529-42.
- Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, et al. The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *J Hypertens*. 2007;25(10):2100-4.
- Lam DK, Dang D, Zhang J, Dolan JC, Schmidt BL. Novel animal models of acute and chronic cancer pain: a pivotal role for PAR2. *J Neurosci*. 2012;32(41):14178-83.
- Lee ZW, Zhou J, Chen CS, et al. The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2011;6(6):e21077.
- Lei YP, Liu CT, Sheen LY, Chen HW, Lii CK. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide protect endothelial nitric oxide synthase against damage by oxidized low-density lipoprotein. *Mol Nutr Food Res*. 2010 ;54 Suppl 1:S42-52.
- Li L, Rose P, Moore PK. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:169-87.
- Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radic Biol Med*. 2009 ;47(1):103-13.
- Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*. 2008;117(18):2351-60.
- Linley JE, Rose K, Patil M, Robertson B, Akopian AN, Gamper N. Inhibition of M current in sensory neurons by exogenous proteases: a signaling pathway mediating inflammatory nociception. *J Neurosci*. 2008;28(44):11240-9.
- Liu B, Escalera J, Balakrishna S, et al. TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. *FASEB J*. 2013;27(9):3549-63.
- Liu Q, Weng HJ, Patel KN, et al. The distinct roles of two GPCRs, MrgprC11 and PAR2, in itch and hyperalgesia. *Sci Signal*. 2011;4(181):ra45.
- Liu T, Ji RR. New insights into the mechanisms of itch: are pain and itch controlled by distinct mechanisms? *Pflugers Arch*. 2013;465(12):1671-85.
- Liu T, Ji RR. Oxidative stress induces itch via activation of transient receptor potential subtype ankyrin 1 in mice. *Neurosci Bull*. 2012;28(2):145-54.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

Ogawa H, Takahashi K, Miura S, et al. H<sub>2</sub>S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience.* 2012;218:335-43.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rodrigues L. Efeito de doadores de H<sub>2</sub>S no controle do prurido e inflamação cutânea em camundongos. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 2002;16(13):1792-8.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20(21):6008-16.

Zhao Y, Biggs TD, Xian M. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) releasing agents: chemistry and biological applications. *Chem Commun (Camb)*. 2014b;50(80):11788-805.

Zhao Y, Pacheco A, Xian M. Medicinal chemistry: insights into the development of novel H<sub>2</sub>S donors. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;230:365-88.

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