

ROBSON DA COSTA

**PAPEL DO RECEPTOR ATIVADO POR  
PROTEINASES-2 (PAR-2) NO COMPORTAMENTO DE  
COÇAR EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. João Batista Calixto

**FLORIANÓPOLIS-SC  
2009**

Costa, Robson da. **Papel do receptor ativado por proteínases-2 (PAR-2) no comportamento de coçar em camundongos.** Florianópolis, 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC.

Orientador: João Batista Calixto  
Defesa: 09/02/2009

O objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis mecanismos e mediadores envolvidos no comportamento de coçar causado pela administração intradérmica (i.d.), no dorso de camundongos, de agonistas do receptor ativado por proteínases-2 (PAR-2). Ambos os agonistas do PAR-2, tripsina e SLIGRL-NH<sub>2</sub>, causaram comportamento de coçar, sugestivo de prurido, de maneira dependente da dose. Esse efeito foi bloqueado pelo co-tratamento com o antagonista seletivo para o receptor PAR-2, FSLLRY-NH<sub>2</sub>, ou pela dessensibilização prévia deste receptor. A participação do sistema opióide foi verificada pelo tratamento com morfina ou naloxona, agonista e antagonista dos receptores opióides, respectivamente, que inibiram a coceira induzida pela tripsina. Além disso, o comportamento pruriginoso induzido por esta enzima foi prevenido pelo tratamento com os antiinflamatórios, celecoxibe (inibidor seletivo para a COX-2) ou dexametasona (corticóide). A participação de mastócitos também foi observada, uma vez que o pré-tratamento com composto 48/80, degranulador de mastócitos, ou com cromoglicato de sódio, estabilizador de mastócitos, reduziu a prurido causado pela tripsina. Ademais, o modelo parece ser dependente da ativação do receptor histaminérgico H<sub>4</sub>, mas não dos receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub>, já que o antagonista não-seletivo H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> (tioperamida), mas não os antagonistas seletivos H<sub>1</sub> (pirilamina e loratadina), H<sub>2</sub> (cimetidina e ranitidina) ou H<sub>3</sub> (iodofempopite), bloqueou o efeito pruriginoso da tripsina. O antagonista misto dos receptores histaminérgicos/serotoninérgicos, ciproeptadina, e o inibidor não seletivo de proteases, gabexato mesilato, foram eficazes em reduzir o prurido causado pelos agonistas do PAR-2, sugerindo o envolvimento da serotonina e da liberação de proteases. Interessantemente, o tratamento neonatal com capsaicina, ou o tratamento do adulto com resiníferatoxina, estratégias que promovem dessensibilização e/ou destruição de fibras sensoriais, preveniram o comportamento pruriginoso evocado por ambos os agonistas do PAR-2. Similarmente, o tratamento com o antagonista seletivo para o receptor TRPV1, SB366791, ou a deleção do gene para este receptor, inibiram o prurido induzido pela ativação do PAR-2. Esta resposta também foi dependente dos neuropeptídeos substância P (SP), neurocinina B (NKB) e CGRP, uma vez que o tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores NK<sub>1</sub> (FK888, para SP), NK<sub>3</sub> (SR142801, para NKB), ou CGRP<sub>1</sub> (fragmento CGRP<sub>8-37</sub>, para o CGRP), reduziu a coceira induzida pelos ativadores do PAR-2. Por fim, o pré-tratamento com antagonistas seletivos para os receptores B<sub>2</sub> (Hoe 140 ou FR173657) ou B<sub>1</sub> (DALBK ou SSR240612) das cininas, ou a deleção gênica destes receptores, preveniu a coceira induzida por ambos os agonistas do PAR-2. Em conjunto, estes resultados sugerem que a injeção i.d. de agonistas do PAR-2 constitui um modelo experimental reproduzível para o estudo de mecanismos e de possíveis abordagens terapêuticas, relacionados à promoção da coceira mediada pela liberação de proteases e ativação do PAR-2. Diferentes mediadores e tipos celulares liberados ou localizados na pele parecem contribuir para este processo. De relevância, neste sentido ressalta-se o envolvimento de mediadores da inflamação neurogênica, de fibras sensoriais, do receptor TRPV1, e de ambos os receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> para as cininas.

Palavras-chave: PAR-2, tripsina, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, comportamento de coçar, camundongo

## ***AGRADECIMENTOS***

*A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.*

*Meu especial agradecimento a:*

**Professor João Batista Calixto,**

pela orientação e ensinamentos passados durante os anos de iniciação científica e mestrado.

**Minhas amigas, Denise Mollica Marotta e Marianne Neves Manjavachi,**

pela contribuição em muitos dos experimentos dessa Dissertação, amizade, e bons momentos.

**Elizabeth S. Fernandes “Betinha”,**

pela realização dos experimentos com animais nocaute para o TRPV1 em Londres, contribuição na primeira etapa deste trabalho, quando ainda aqui no Brasil, e por sua amizade.

**Emerson M. Motta,**

pela troca de idéias, apoio e parceria no desenvolvimento deste e de outros trabalhos durante o período de mestrado, e por sua amizade.

**Maria Martha Campos,**

pelas suas considerações, que contribuíram para a versão final deste trabalho, e parceria na realização de outros trabalhos durante o período de mestrado.

**Dr. Susan D. Brain** (King's College London),

pela concessão dos experimentos com animais nocaute para o receptor TRPV1.

**Professor João Bosco Pesquero (UNIFESP),**

pela doação dos animais nocaute para os receptores cininérgicos.

**Professor Luiz Juliano (UNIFESP),**

pela síntese dos peptídeos agonista e antagonista para o PAR-2.

**Ana Paula Luiz, Maíra Bicca e Juliana Fabris,**

pelo auxílio em alguns experimentos deste trabalho.

**Aline Venâncio, Juliana Gonçalves e Pedro,**

pelo suporte técnico durante estes anos.

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior,**

pelo apoio financeiro.

**Meus pais, Nilza e Lauro,**

pela confiança e apoio no meu engajamento na carreira científica.

*“Ali ficam as respostas. Ali ficaram as dúvidas.”*

**Lindolf Bell**

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| <b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b> .....  | i   |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....  | iii |
| <b>RESUMO</b> .....  | v   |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | vi  |
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 01  |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 23  |
| <b>Objetivo geral</b> .....  | 23  |
| <b>Objetivos específicos</b> .....   | 23  |
| <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 25  |
| <b>Animais</b> .....   | 25  |
| <b>Comportamento de coçar em camundongos</b> .....   | 26  |
| <b>Nocicepção espontânea induzida pela tripsina em camundongos</b> .....   | 27  |
| <b>Vias de administração</b> .....   | 28  |
| 1. Administração intratecal (i.t.) de drogas.....  | 28  |
| 2. Administração intracerebroventricular (i.c.v.) de drogas.....   | 28  |
| 3. Protocolo geral de administração de drogas.....   | 29  |
| <b>Análise dos mecanismos farmacológicos envolvidos no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos</b> .....                | 30  |
| 1. Verificação do envolvimento da atividade proteolítica da tripsina no comportamento de coçar induzido por esta enzima em camundongos.....                    | 30  |
| 2. Análise da participação do receptor PAR-2 no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos.....                                     | 30  |
| 3. Avaliação do envolvimento do sistema opioide no comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina.....                                 | 31  |
| 4. Verificação do efeito de anti-inflamatórios esteroide e não-esteroidais sobre o comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina..... | 31  |
| 5. Avaliação da participação de mastócitos no comportamento de coçar induzido tripsina em camundongos.....   | 32  |

|  |    |
|--|----|
| 6. Verificação do envolvimento de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos no comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos por agonistas do PAR-2.....                                  | 33 |
| 7. Avaliação da contribuição da liberação de proteases para o comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos .....  | 34 |
| 8. Participação de fibras sensíveis a capsaicina no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos.....   | 34 |
| 9. Avaliação do envolvimento de receptores TRPV1 no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos.....   | 35 |
| 10. Análise do envolvimento de neuropeptídeos no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos.....  | 36 |
| 11. Caracterização do envolvimento dos receptores B <sub>2</sub> e B <sub>1</sub> para as cininas no comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos por agonistas do PAR-2 em camundongos..... | 37 |
| <b>Drogas e reagentes</b> .....  | 38 |
| <b>Análise estatística</b> .....   | 39 |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 40 |
| Comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos .....   | 40 |
| Envolvimento do sistema opioidérgico no comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina.....  | 45 |
| Efeito do tratamento com antiinflamatórios esteroidal e não-esteroidais sobre o comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina.....  | 40 |
| Papel dos mastócitos e de mediadores mastocitários no comportamento de coçar induzido agonistas do PAR-2 em camundongos .....  | 48 |
| Papel de fibras sensíveis a capsaicina e do receptor TRPV1 no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos .....   | 53 |
| Participação de neuropeptídeos no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos .....   | 55 |

|   |     |
|---|-----|
| Envolvimento de ambos os receptores B <sub>2</sub> e B <sub>1</sub> para as cininas no comportamento de coçar e na nocicepção espontânea induzidos por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos ..... | 57  |
| Envolvimento dos receptores cininérgicos e do receptor PAR-2 no comportamento de coçar induzido por diferentes agentes pruriginosos em camundongos .....  | 64  |
| <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 66  |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....   | 101 |
| <b>ANEXOS</b> .....   | 117 |



## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Receptores ativados por proteinases (PARs): estrutura, localização, ligantes e agonistas.....   | 11 |
| <b>Figura 1</b> - Mecanismo de ativação dos receptores ativados por proteinases (PARs) .....  | 10 |
| <b>Figura 2</b> - Comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 e pelo composto 48/80 em camundongos Swiss .....   | 42 |
| <b>Figura 3</b> – Envolvimento da atividade proteolítica da tripsina e do receptor PAR-2 no comportamento de coçar induzido pelos agonistas do PAR-2 em camundongos Swiss .....   | 44 |
| <b>Figura 4</b> – Efeito do tratamento com agonista e antagonista opioidérgicos, ou antiinflamatórios esteroidal e não esteroidais sobre o comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina em camundongos Swiss..... | 47 |
| <b>Figura 5</b> – Participação de mastócitos no comportamento de coçar induzido pela tripsina em camundongos Swiss.....   | 49 |
| <b>Figura 6</b> – Participação de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos Swiss.....   | 51 |
| <b>Figura 7</b> - Participação de proteases no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos Swiss.....   | 52 |
| <b>Figura 8</b> - Papel de fibras sensíveis à capsaicina e do receptor TRPV1 no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos.....   | 54 |
| <b>Figura 9</b> - Papel de neuropeptídeos no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos Swiss .....   | 56 |
| <b>Figura 10</b> - Efeito do bloqueio do receptor B <sub>2</sub> para cininas sobre comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos.....   | 59 |
| <b>Figura 11</b> - Efeito do bloqueio do receptor B <sub>1</sub> para cininas sobre comportamento de coçar induzido por ativadores do receptor PAR-2 em camundongos.....  | 60 |

**Figura 12** - Envolvimento dos receptores cininérgicos na nocicepção espontânea induzida pela ativação do receptor PAR-2 em camundongos ..... 61

**Figura 13** - Efeito do tratamento com antagonistas dos receptores cininérgicos administrados por diferentes vias sobre o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH2 (100 µg/sítio, i.d.) ..... 63

**Figura 14** - Envolvimento dos receptores cininérgicos e do receptor PAR-2 no comportamento de coçar induzido por diferentes agentes pruriginosos em camundongos C57BL/6 ..... 65

**Figura 15** - Representação esquemática dos possíveis mecanismos, periféricos (A) e centrais (B), envolvidos no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos..... 99

## *ABREVIATURAS*

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>5-HT</b>           | 5-hidroxitriptamina                                   |
| <b>12-HPETE</b>       | 12-hidroperoxieicosatetraenoico                       |
| <b>BBB</b>            | Barreira hemato-encefálica                            |
| <b>BDNF</b>           | Fator neurotrófico derivado do cérebro                |
| <b>BK</b>             | Bradicinina   |
| <b>B<sub>1</sub>R</b> | Receptor B <sub>1</sub>                               |
| <b>B<sub>2</sub>R</b> | Receptor B <sub>2</sub>                               |
| <b>C48/80</b>         | Composto 48/80  |
| <b>CGRP</b>           | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina           |
| <b>COX</b>            | Ciclooxigenase  |
| <b>DABK</b>           | des-Arg <sup>9</sup> -bradicinina                     |
| <b>DALBK</b>          | des-Arg <sup>9</sup> -[Leu <sup>8</sup> ]-bradicinina |
| <b>DRG</b>            | Gânglio da raiz dorsal                                |
| <b>i.c.v.</b>         | intracereborventricular                               |
| <b>i.p.</b>           | Intraperitoneal                                       |
| <b>i.pl.</b>          | Intraplantar  |
| <b>i.t.</b>           | Intratecal  |
| <b>i.v.</b>           | Intravenoso   |
| <b>MAPK</b>           | proteínas quinases ativadas por mitógenos             |
| <b>NK</b>             | Neurocinina   |
| <b>NGF</b>            | Fator de crescimento derivado do nervo                |
| <b>GPCR</b>           | Receptores acoplados à proteína G                     |
| <b>GRP</b>            | Peptídeo liberador de gastrina                        |

|              |  |
|--------------|--|
| <b>PAR</b>   | Receptor ativado por proteínases                   |
| <b>PGs</b>   | Prostaglandinas                                    |
| <b>PKC</b>   | Proteína quinase C                                 |
| <b>PKA</b>   | Proteína quinase A                                 |
| <b>PLA</b>   | Fosfolipase A                                      |
| <b>PLC</b>   | Fosfolipase C                                      |
| <b>RTX</b>   | Resiníferatoxina                                   |
| <b>s.c.</b>  | Subcutâneo   |
| <b>SNC</b>   | Sistema nervoso central                            |
| <b>SP</b>    | Substância P                                       |
| <b>TRPV1</b> | Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 |

## **RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis mecanismos e mediadores envolvidos no comportamento de coçar causado pela administração intradérmica (i.d.), no dorso de camundongos, de agonistas do receptor ativado por proteinases-2 (PAR-2). Ambos os agonistas do PAR-2, tripsina e SLIGRL-NH<sub>2</sub>, causaram comportamento de coçar, sugestivo de prurido, de maneira dependente da dose. Esse efeito foi bloqueado pelo co-tratamento com o antagonista seletivo para o receptor PAR-2, FSLLRY-NH<sub>2</sub>, ou pela dessensibilização prévia deste receptor. A participação do sistema opióide foi verificada pelo tratamento com morfina ou naloxona, agonista e antagonista dos receptores opióides, respectivamente, que inibiram a coceira induzida pela tripsina. Além disso, o comportamento pruriginoso induzido por esta enzima foi prevenido pelo tratamento com os antiinflamatórios, celecoxibe (inibidor seletivo para a COX-2) ou dexametasona (corticóide). A participação de mastócitos também foi observada, uma vez que o pré-tratamento com composto 48/80, degranulador de mastócitos, ou com cromoglicato de sódio, estabilizador de mastócitos, reduziu a prurido causado pela tripsina. Ademais, o modelo parece ser dependente da ativação do receptor histaminérgico H<sub>4</sub>, mas não dos receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub>, já que o antagonista não-seletivo H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> (tioperamida), mas não os antagonistas seletivos H<sub>1</sub> (pirilamina e loratadina), H<sub>2</sub> (cimetidina e ranitidina) ou H<sub>3</sub> (iodofempopite), bloqueou o efeito pruriginoso da tripsina. O antagonista misto dos receptores histaminérgicos/serotoninérgicos, ciproeptadina, e o inibidor não seletivo de proteases, gabexato mesilato, foram eficazes em reduzir o prurido causado pelos agonistas do PAR-2, sugerindo o

envolvimento da serotonina e da liberação de proteases. Interessantemente, o tratamento neonatal com capsaicina, ou o tratamento do adulto com resiníferatoxina, estratégias que promovem dessensibilização e/ou destruição de fibras sensoriais, preveniram o comportamento pruriginoso evocado por ambos os agonistas do PAR-2. Similarmente, o tratamento com o antagonista seletivo para o receptor TRPV1, SB366791, ou a deleção do gene para este receptor, inibiram o prurido induzido pela ativação do PAR-2. Esta resposta também foi dependente dos neuropeptídeos substância P (SP), neurocinina B (NKB) e CGRP, uma vez que o tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores NK<sub>1</sub> (FK888, para SP), NK<sub>3</sub> (SR142801, para NKB), ou CGRP<sub>1</sub> (fragmento CGRP<sub>8-37</sub>, para o CGRP), reduziu a coceira induzida pelos ativadores do PAR-2. Por fim, o pré-tratamento com antagonistas seletivos para os receptores B<sub>2</sub> (Hoe 140 ou FR173657) ou B<sub>1</sub> (DALBK ou SSR240612) das cininas, ou a deleção gênica destes receptores, preveniu a coceira induzida por ambos os agonistas do PAR-2. Em conjunto, estes resultados sugerem que a injeção i.d. de agonistas do PAR-2 constitui um modelo experimental reprodutível para o estudo de mecanismos e de possíveis abordagens terapêuticas, relacionados a promoção da coceira mediada pela liberação de proteases e ativação do PAR-2. Diferentes mediadores e tipos celulares liberados ou localizados na pele parecem contribuir para este processo. De relevância, neste sentido ressalta-se o envolvimento de mediadores da inflamação neurogênica, de fibras sensoriais, do receptor TRPV1, e de ambos os receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> para as cininas.

## ***ABSTRACT***

The aim of this study was to investigate some mechanisms and mediators underlying the scratching behaviour induced by intradermal (i.d.) injection of proteinase activated receptor-2 (PAR-2) agonists on the back of the mouse neck. Both PAR-2 agonists, trypsin and SLIGRL-NH<sub>2</sub>, were able to evoke a marked and dose-related scratching behaviour in mice. This response was widely reduced by the co-treatment with the selective PAR-2 receptor antagonist, FSLRY-NH<sub>2</sub>, or by previous trypsin-induced PAR-2 receptor desensitization. Opioidergic system involvement was evaluated by the treatment with morphine or naloxone, a non-selective opioid receptors agonist and antagonist, respectively, which were both effective against trypsin-induced itch. Moreover, trypsin-induced scratching behaviour was blocked by the pre-treatment with celecoxib (a selective COX-2 inhibitor) or dexamethasone (a corticoid). Also, contribution of mast cells was evident as the scratching behaviour induced by trypsin was prevented by the pre-treatment with compound 48/80, a mast cell degranulator, or disodium cromoglycate, a mast cell stabilizer. Furthermore, PAR-2 receptor activation-induced scratching behaviour seems to be dependent on histamine H<sub>4</sub> receptor activation, but not histamine H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> or H<sub>3</sub> receptors, as the pre-treatment with the dual histamine H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> receptors antagonist (thioperamide), but not with the selective histamine H<sub>1</sub> (pyrilamine or loratadine), H<sub>2</sub> (cimetidine or ranitidine) or H<sub>3</sub> (iodophenpropit) receptor antagonists, was able to interfere with trypsin response. Pre-treatment with the mixed serotonergic/histaminergic receptor antagonist, cyproheptadine, or the non-selective protease inhibitor, gabexate mesylate, were capable of inhibiting trypsin-induced pruritus,

suggesting the participation of serotonergic receptors and protease release. Interestingly, both neonatal capsaicin treatment and resiniferatoxin administration to adult mice, to promote sensorial fiber desensitization and/or destruction, were able to suppress the itching response induced by PAR-2 agonists. Similarly, the selective TRPV1 receptor antagonist, SB366791, or the genetic deletion of TRPV1, greatly diminished the PAR-2-induced scratching behaviour. The pruritogenic response induced by PAR-2 agonists in mice is widely dependent on the release of neuropeptides substance P (SP), CGRP and neurokinin B (NKB), as the treatment with the selective NK<sub>1</sub> (FK888, for SP), NK<sub>3</sub> (SR142801, for NKB) or CGRP<sub>1</sub> (fragment CGRP<sub>8-37</sub>, for CGRP) receptor antagonists caused a marked reduction of PAR-2-induced pruritus. Of note, the pre-treatment with both kinin B<sub>2</sub> (Hoe 140 or FR173657) and B<sub>1</sub> (DALBK or SSR240612) receptor antagonists, or the genetic ablation of kinin receptors, significantly diminished the scratching behaviour evoked by PAR-2 agonists. Take together, the results of the present study suggest that i.d. injection of PAR-2 agonists on the back of the mouse neck seems to be a reproducible model to study the mechanisms and therapeutic strategies, related to itch transmission caused by proteinases release and PAR-2 activation. Besides, this response is widely dependent on mast cell activation and subsequently release of neurokinins, kinins and the TRPV1 receptor activation.



## ***INTRODUÇÃO***

O prurido, ou coceira, é uma sensação cutânea desagradável que leva ao desejo imediato de coçar. Da mesma forma que outras sensações cutâneas, como por exemplo a dor, o prurido atua como um mecanismo fisiológico de defesa contra a ação de agentes nocivos externos (Ständer *et al.*, 2003). Apesar da sua função auto-protetora, a coceira também é um sintoma comum que acompanha muitas doenças inflamatórias da pele, incluindo dermatite atópica e psoríase ou, até mesmo, algumas condições sistêmicas, tais como doença renal crônica, colestase e infecção pelo vírus HIV. Ademais, o prurido pode ocorrer como um efeito adverso ao uso de determinados medicamentos, como o antimalárico cloroquina ou o analgésico morfina (para revisão, ver Paus *et al.*, 2006; Ikoma *et al.*, 2006).

O ato de coçar, quando frequente e/ou intenso, pode levar ao surgimento de lesões na pele, favorecendo o aparecimento de infecções, além da liberação de mediadores inflamatórios, que potencialmente induzem ou agravam o prurido, intensificando o ato de coçar (Steinhoff *et al.*, 2006). Este ciclo de “prurido-coçadura” é frequentemente resistente à terapia anti-pruriginosa clássica, que consiste principalmente no emprego sistêmico de anti-histamínicos (antagonistas do receptor H<sub>1</sub> para a histamina) ou de corticóides tópicos (Klein *et al.*, 1999; para revisão, ver Herman e Vender, 2003). Apesar de inúmeras tentativas na busca de uma nova alternativa terapêutica, não existe até o momento tratamento eficaz para a cura ou alívio da coceira em tais circunstâncias. O prurido crônico pode causar sérios prejuízos à qualidade de

vida, uma vez que pode estar associado a distúrbios psicológicos, tais como privação de sono, ansiedade e depressão (Sheehan-Dare *et al.*, 1990; Hashiro e Okumura, 1997). Neste sentido, a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos na neurotransmissão da sensação pruriginosa tem como foco principal a identificação de novos alvos moleculares destinados ao desenvolvimento de fármacos anti-pruriginosos mais efetivos para o tratamento de condições de coceira crônica que não respondem à farmacoterapia atual.

Embora existam algumas semelhanças com a transmissão do estímulo doloroso, evidências atuais indicam a ocorrência de uma via sensorial especializada na transmissão do estímulo pruriginoso, que conecta o tecido cutâneo ao sistema nervoso central (SNC) (Schmelz, 2001). De fato, as respostas comportamentais provocadas por ambas as sensações são distintas: a dor induz o reflexo de retirada e, o prurido, o reflexo de coçar (Schmelz e Handwerker, 2005; Schmelz *et al.*, 2005). Sendo assim, ao contrário do que se pensava anteriormente (de acordo com a teoria da intensidade (von Frey, 1922)), o prurido não pode ser considerado simplesmente uma sub-modalidade menos intensa de dor, mas sim uma sensação individual do sistema nervoso sensorial (teoria da especificidade (Schmelz *et al.*, 1997; Schmelz, 2001; Andrew e Craig (2001))). Apesar disso, alguns estudos sugerem estreita interação entre estas duas modalidades sensoriais, onde o prurido pode ser inibido por estímulos dolorosos ou, contrariamente, causado pelo estado de analgesia. A coceira induzida pela injeção de histamina na pele de humanos saudáveis é reduzida pela aplicação de diferentes estímulos nocivos, tais como: térmico (calor e frio nocivos), mecânico, químico e elétrico. Isto ocorre, possivelmente, através de mecanismos de ação central (para revisão, ver Schmelz, 2001; 2005; Ikoma *et al.*, 2006). Além disso,

estudos recentes têm demonstrado que o estado de analgesia, causado pela administração de agonistas dos receptores opióides, promove prurido por meio da degranulação local de mastócitos, mas principalmente por mecanismos centrais (Blunk *et al.*, 2004 citado por Schmelz e Handwerker, 2005; Umeuchi *et al.*, 2003). Este fenômeno é particularmente relevante para agonistas do receptor  $\mu$  (mu) opióide administrados na medula espinhal, os quais induzem analgesia segmental, frequentemente combinada com prurido (Andrew *et al.*, 2003, citado por Schmelz, 2005). Estudos da literatura demonstram a eficácia de antagonistas do receptor  $\mu$  opióide contra o prurido associado à colestase biliar (Jones, 2002). Desse modo, acredita-se que as vias neuronais pruriceptivas sejam tonicamente inibidas pela atividade de neurônios nociceptivos, localizados em estruturas centrais e que agonistas opióides causam ou intensificam a coceira por diminuírem a atividade destas últimas células sobre a via pruriceptiva (Schmelz, 2001; 2005).

A sensação dolorosa é o produto da ativação periférica de alguns subtipos de terminações nervosas livres, denominadas de nociceptores, localizadas na pele, órgãos e tecidos internos, que transmitem as informações nociceptivas da periferia para os neurônios secundários do corno dorsal na medula espinhal, pela liberação de neurotransmissores. Através das vias ascendentes, o estímulo nociceptivo é retransmitido da medula espinhal para as áreas supra-espinhais, responsáveis pela codificação da informação dolorosa, que incluem a formação reticular, o tálamo e o córtex cerebral. Os impulsos gerados nas terminações nervosas são propagados por quatro categorias de neurônios sensoriais, classificados de acordo com o diâmetro e estrutura da fibra, e com a velocidade de condução do impulso gerado. As fibras sensoriais

primárias do tipo A $\alpha$  e A $\beta$  apresentam grande diâmetro, camada espessa de mielina, alta velocidade de condução (30–100 m/s), sendo normalmente responsáveis pela transmissão das informações proprioceptivas, como toque leve e pressão. Por outro lado, a transmissão da informação nociceptiva ocorre através da ativação de fibras A $\delta$  e C. As fibras A $\delta$  possuem diâmetro médio, fina bainha de mielina e são caracterizadas por condução semi-rápida (aproximadamente 12-30 m/s). Contrariamente, as fibras C são de pequeno diâmetro, amielinizadas e responsáveis pela condução lenta do impulso nervoso (aproximadamente 0,5-2 m/s). A estimulação de fibras A $\delta$  promove resposta rápida que resulta na dor aguda, ou dor de primeira fase, que frequentemente desencadeia o reflexo de retirada, enquanto que a ativação de fibras C leva a uma resposta duradoura, responsável por dor difusa, geralmente secundária à dor aguda (para revisão, ver Julius e Basbaum, 2001; Almeida *et al.*, 2004).

A maioria das fibras C podem responder a todos os estímulos nocivos, ou seja, estímulos mecânicos, térmicos, ou químicos, e por esta razão são chamadas de fibras polimodais. As fibras sensoriais polimodais possuem receptores termosensíveis ativados por estímulos quentes ou frios, mecanorreceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias algogênicas, tais como prostaglandinas (PGs), bradicinina (BK), serotonina (5-HT - 5-hidroxitriptamina), proteases e histamina (Julius e Basbaum, 2001; Almeida *et al.*, 2004). No entanto, existem alguns subtipos de fibras C que, em condições normais, são insensíveis a estímulos mecânicos ou, ainda, a estímulos mecânicos e térmicos, que são chamadas de fibras silenciosas. Tais fibras são responsáveis pela geração de eritema (reflexo axonal) e sensibilização a estímulos mecânicos

(Schmidt *et al.*, 1995; Weidner *et al.*, 1999; Klede *et al.*, 2003). Além disso, as fibras C podem ser agrupadas em duas classes de acordo com o padrão de expressão de seus neurotransmissores e proteínas. A primeira população, chamada de fibras C peptidérgicas, contém como neurotransmissores os peptídeos substância P (SP) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), e expressam o receptor de tirosina quinase A (TrkA), que apresenta alta afinidade para o fator de crescimento do nervo (NGF). A segunda população expressa o sítio de ligação para isolectina B<sub>4</sub> (IB<sub>4</sub>) e também receptores purinérgicos P2X<sub>3</sub>, um subtipo específico de canal iônico para o ATP. Porém, estas fibras não contêm SP e CGRP e, por isso, são chamadas de não-peptidérgicas. Apesar das diferenças quanto ao perfil de expressão de alguns neurotransmissores, o glutamato é o neurotransmissor excitatório predominante em todos os neurônios nociceptivos. Além disso, ambas as populações de fibras C respondem a estímulos nocivos semelhantes, e expressam o receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), sensível à ativação por capsaicina, prótons e calor (Julius e Basbaum, 2001; Almeida *et al.*, 2004 ).

Nas últimas décadas, muitos esforços foram realizados na tentativa de elucidar as bases neuronais da sensação de coceira (Schmelz, 2001). No entanto, somente no final dos anos 90, Schmelz e colaboradores (1997) demonstraram a existência de neurônios especializados na condução do estímulo pruriginoso. A partir de estudos de microneurografia, para mensurar a atividade de fibras cutâneas em humanos, estes autores demonstraram que a aplicação de histamina por iontoforese na pele de voluntários sadios é capaz de ativar seletivamente uma população de fibras não-mielinizadas, insensíveis a

estímulos mecânicos, cuja ativação está paralelamente associada com o desencadeamento da sensação de coceira (Schmelz *et al.*, 1997). As “fibras do prurido”, ou pruriceptores, correspondem a 5% das fibras C aferentes, e são caracterizadas por baixa velocidade de condução (0,5 m/s), grandes territórios de inervação, alto limiar elétrico cutâneo, não-responsividade a estímulos mecânicos, ausência de atividade espontânea, resposta sustentada à aplicação de histamina e geração de eritema reflexo (Schmelz *et al.*, 1997; Schmelz *et al.*, 2003a). Porém, embora de modo menos pronunciado, estas fibras também respondem à PGE<sub>2</sub>, 5-HT, acetilcolina e BK, ao contrário dos nociceptores (fibras polimodais) que são praticamente insensíveis, ou respondem fracamente à histamina, mas apresentam altos padrões de disparo após aplicação de PGE<sub>2</sub>, BK ou capsaicina (Schmelz *et al.*, 2003a). Ademais, por meio de experimentos de microneurografia em um paciente com dermatite atópica, Schmelz e colaboradores (2003b) demonstraram a presença de atividade espontânea em algumas fibras aferentes primárias, com características similares aos pruriceptores, sugerindo que a coceira em indivíduos atópicos pode ser causada pela ativação desta sub-população de fibras C.

Corroborando estes achados, Andrew e Craig (2001), utilizando a medula espinhal de gatos, demonstraram a existência de neurônios do trato espino-talâmico, que respondem a aplicação por iontoforese de histamina na pele, com um perfil temporal de resposta similar àquele obtido por Schmelz e colaboradores (1997). Estes neurônios se projetam da camada superficial do corno dorsal da medula espinhal (lâmina I) para o tálamo, e apresentam características similares aos pruriceptores descritos anteriormente, como não-

responsividade a estímulos mecânicos, baixa velocidade de condução, alto limiar elétrico e ausência de atividade espontânea (Andrew e Craig, 2001; Schmelz, 2001).

Recentemente, alguns estudos conduzidos em roedores têm dado base aos mecanismos envolvidos nas vias neurais responsáveis pela coceira. Em uma recente publicação, Shim e colaboradores (2007) demonstraram que a aplicação intradérmica (i.d.) de histamina no dorso de camundongos promove comportamento sugestivo de prurido, caracterizado pelo aumento no número de acessos de coceira ao sítio injetado. Esse efeito é mediado pelo receptor  $H_1$  para a histamina, localizado em fibras aferentes primárias, e é dependente da estimulação do receptor TRPV1, via ativação das enzimas fosfolipase  $A_2$  e 12-lipoxigenase (Shim *et al.*, 2007). Além disso, foi previamente demonstrado que a enzima fosfolipase  $C\beta$ , expressa em fibras aferentes não-mielinizadas, parece desempenhar papel-chave no comportamento pruriginoso desencadeado pela ativação do receptor  $H_1$  para a histamina em camundongos (Han *et al.*, 2006). Por fim, Sun e Chen (2007) verificaram que o peptídeo liberador de gastrina (GRP), expresso no corno dorsal da medula espinhal, medeia o comportamento pruriginoso induzido pela aplicação i.d. de diferentes agentes em camundongos, através do seu receptor (GRPR) localizado na medula espinhal. Estes autores demonstraram ainda que animais com deleção do gene para GRPR (GRPR<sup>-/-</sup>), ou tratados com o antagonista seletivo para este receptor, apresentaram redução no comportamento pruriginoso, mas não no comportamento nociceptivo, induzido por diferentes agentes em camundongos (Sun e Chen, 2007).

O processamento supra-espinhal da coceira tem sido recentemente investigado em humanos, através de estudos de imagens usando tomografia de emissão de pósitrons (PET) e imagem de ressonância magnética funcional (fMRI) (para revisão, ver Ikoma *et al.*, 2006; Paus *et al.*, 2006). A aplicação de histamina por via i.d. ou através de punctura, na pele de humanos saudáveis, causa ativação de diferentes estruturas cerebrais, incluindo córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, córtex somatossensorial primário (S1), área pré-motora, área motora suplementar e lobo parietal inferior (predominantemente no hemisfério esquerdo) (Darsow *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 2003). Algumas diferenças no padrão de ativação de áreas centrais entre dor e prurido têm sido descritas. Ao contrário da dor, a coceira parece ser caracterizada pela falta de ativação do córtex somatossensorial secundário (S2) e pela ativação predominante das áreas motoras ipsilaterais ao estímulo aplicado (Drzezga *et al.*, 2001).

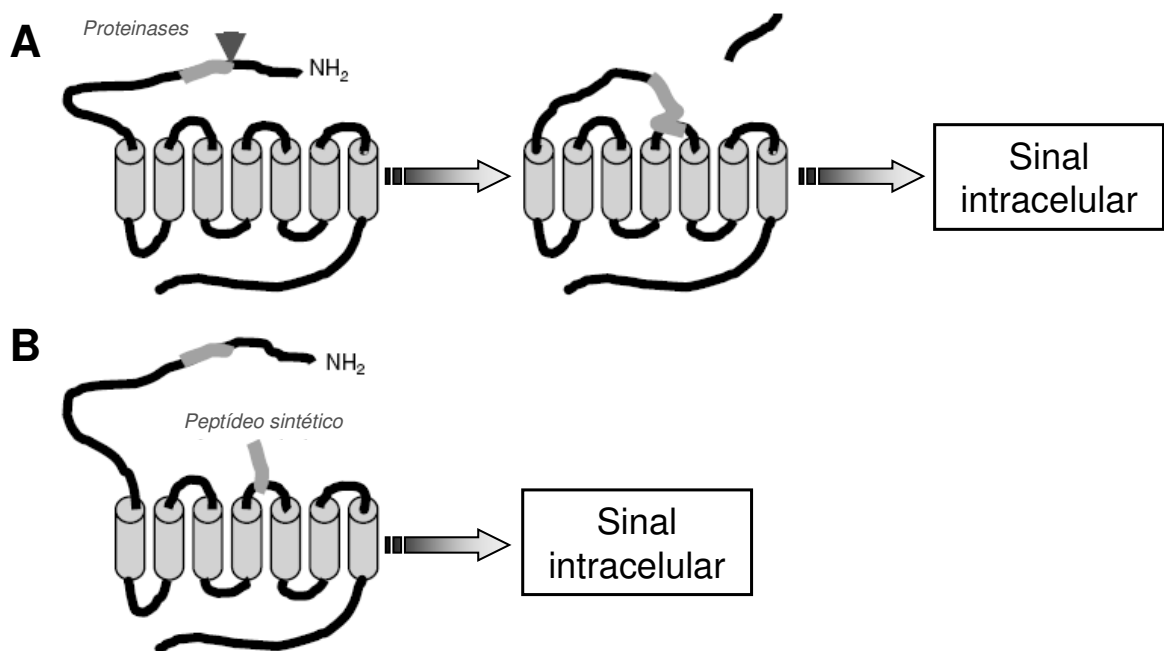
Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos nas vias neuronais da transmissão da coceira, obtidos através de estudos baseados na responsividade à histamina, algumas evidências atuais sugerem a existência de subtipos de fibras pruriceptivas que são insensíveis a este mediador (Ikoma *et al.*, 2005; Jonaheek *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2007). Acredita-se que tais fibras possam ser a explicação para as submodalidades de prurido que são insensíveis ao tratamento com anti-histamínicos em diferentes condições clínicas. Recentemente, foi demonstrado que a estimulação elétrica cutânea (de baixa intensidade e alta frequência) em humanos sadios é capaz de gerar coceira, sem causar eritema reflexo, característico da aplicação de histamina, sugerindo que estas fibras não pertencem aos pruriceptores sensíveis a este mediador (Ikoma *et al.*, 2005). Ademais, a sensação de coceira, sem a presença de



eritema, pode ser gerada pela mucunáína, uma protease presente no *cowhage*, espículas obtidas da planta tropical *Mucuna pruriens* (Shelley e Arthur, 1955; Jonahek *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2008). A coceira induzida pelo *cowhage* é insensível ao tratamento com anti-histamínicos e parece ser mediada através de aferentes primários, bem como por neurônios espinotalâmicos, distintos daqueles que medeiam o prurido induzido pela histamina (Davidson *et al.*, 2007; Jonahek *et al.*, 2007). Curiosamente, tem sido demonstrado que a aplicação cutânea de *cowhage*, em humanos ou animais de experimentação, causa ativação de fibras C polimodais, mas não é capaz de estimular fibras insensíveis à estímulos mecânicos (Wei e Tuckett, 1991; Namer *et al.*, 2008; Jonahek *et al.*, 2008). De modo relevante, a mucunáína, composto ativo do *cowhage*, foi recentemente identificada como uma nova cisteíno-protease, a qual é capaz de clivar e estimular receptores ativados por proteinases (PARs) dos tipos 2 (PAR-2) e 4 (PAR-4), sugerindo o envolvimento destes receptores no prurido induzido pela aplicação cutânea de *cowhage* (Reddy *et al.*, 2008). De fato, um grande avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos na transmissão da sensação de coceira foi alcançado após a demonstração de que os receptores PAR-2 estão envolvidos na fisiopatologia da coceira em pacientes atópicos (Steinhoff *et al.*, 2003).

Os receptores PARs (Figura 1 e Tabela 1) representam uma classe particular de receptores acoplados a proteína G (GPCR), que são ativados pela clivagem proteolítica de um sítio específico localizado na alça N-terminal do receptor. Conseqüentemente, após a proteólise, ocorre a exposição de um novo fragmento N-terminal que atua como um ligante ancorado ao receptor, ativando a molécula clivada e desencadeando uma resposta intracelular

(Figura 1) (para revisão, ver Macfarlane *et al.*, 2001; Vergnolle, 2003; Steinhoff *et al.*, 2005; Ramachandran e Hollenberg, 2008). A ativação dos receptores PARs pelas proteases é um processo irreversível e a ativação das vias de sinalização desencadeada por estas enzimas é finalizada por um mecanismo eficiente de internalização e dessensibilização do receptor (Trejo, 2003). Até o momento, quatro membros desta família de receptores foram clonados a partir do genoma de humanos e roedores, sendo denominados PAR-1 a PAR-4, de acordo com a ordem de descoberta (Tabela 1) (Vu *et al.*, 1991; Bohm *et al.*, 1996; Ishihara *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998).



**Figura 1** - Mecanismo de ativação dos receptores ativados por proteases (PARs): **(A)** As proteases (representadas pela seta) clivam o domínio N-terminal do receptor na superfície celular, expondo um novo domínio N-terminal, o qual se liga e ativa o receptor, desencadeando uma resposta intracelular. **(B)** Peptídeos sintéticos com sequência de aminoácidos correspondente ao domínio ligante N-terminal podem mimetizar os efeitos de proteases sobre a ativação dos receptores PARs e levar a uma resposta intracelular.

**Tabela 1** – Receptores ativados por proteinases (PARs): estrutura, localização, ligantes e agonistas.

|                               | <b>PAR-1</b>  | <b>PAR-2</b>  | <b>PAR-3</b>   | <b>PAR-4</b>   |
|-------------------------------|---|---|--|--|
| <b>Número de aminoácidos</b>  | 425 aa  | 397 aa  | 374 aa   | 385 aa   |
| <b>Localização</b>            | <i>Tecidos:</i> TGI <sup>a</sup> , vias aéreas, e cérebro.<br><br><i>Células:</i> plaqueta, músculo liso, endotélio, queratinócitos, glia, astrócitos e neurônios.                                  | <i>Tecidos:</i> TGI, pâncreas, rins, fígado, vias aéreas, próstata, ovário, olhos, cérebro e pele.<br><br><i>Células:</i> epitélio, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, músculo liso, leucócitos e glia, astrócitos e neurônios. | <i>Tecidos:</i> TGI, pulmão e fígado.<br><br><i>Células:</i> endotélio, astrócitos e leucócitos. | <i>Tecidos:</i> TGI, pâncreas e pulmão.<br><br><i>Células:</i> plaquetas e leucócitos. |
| <b>Seqüência ligante</b>      | SFLLR-NH <sub>2</sub> (h)<br>SFLLR-NH <sub>2</sub> (r) (c)  | SLIGKV-NH <sub>2</sub> (h)<br>SLIGRL-NH <sub>2</sub> (r) (c)  | TFRGAP-NH <sub>2</sub> (h)<br>SFNGGP-NH <sub>2</sub> (r) (c)                                     | GYPGQV-NH <sub>2</sub> (h)<br>GYPGKF-NH <sub>2</sub> (r) (c)                           |
| <b>Proteinases ativadoras</b> | Catepsina G<br>Fator Xa<br>Granzima A<br>MMP-1 <sup>b</sup><br>Plasmina<br>Tripsina<br>Trombina   | Acrosina<br>Catepsina G<br>Fator Xa<br>HLE <sup>c</sup><br>MT-SP1 <sup>d</sup><br>Mucunaína<br>Proteinase 3<br>TF/FVIIa <sup>e</sup><br>Tripsina<br>Triptase  | Trombina   | Catepsina G<br>Mucunaína<br>Plasmina<br>Tripsina<br>Trombina                           |
| <b>Agonistas</b>              | TFLLR-NH <sub>2</sub><br>SFLLRN-NH <sub>2</sub><br>SFLLR-NH <sub>2</sub><br>AFLLR-NH <sub>2</sub><br>SFALR-NH <sub>2</sub><br>A-Phe (p-Cl)-LLR-NH <sub>2</sub><br>S-Phe (p-F)-LLRNP-NH <sub>2</sub> | SLIGRL-NH <sub>2</sub><br>SLIGKV-NH <sub>2</sub><br>S-Phe (p-F)-IGKV-NH <sub>2</sub><br>SL-Cha-Cha-RL-NH <sub>2</sub><br>trans-cinnamoyl-LIGRLO-NH <sub>2</sub><br>2-furoyl-LIGRL-OH<br>2-furoyl-LIGKV-NH <sub>2</sub>                                      | SFNGGP-NH <sub>2</sub><br>TFRGAP-NH <sub>2</sub>   | GYPGQV-NH <sub>2</sub><br>AYPGKF-NH <sub>2</sub>                                       |

(h) humano; (r) rato; (c) camundongo; <sup>a</sup>TGI – Trato gastrointestinal; <sup>b</sup>MMP-1 – Matrix metaloprotease 1; <sup>c</sup>HLE – elastase de leucócito humano; <sup>d</sup>MT-SP1 – serino-protease do tipo de membrana 1; <sup>e</sup>TF/FVIIa – complexo fator tecidual/fator VIIa.

Fonte: Mcfarlane *et al.*, 2001; Steinhoff *et al.*, 2005; Barry *et al.*, 2006.

Na última década, uma série de proteases foram identificadas como sendo capazes de clivar e ativar os diferentes receptores PAR (Tabela 1) (para revisão, ver Barry *et al.*, 2006). De grande relevância, a tripsina, uma serino-protease de fonte pancreática ou extra-pancreática, pode clivar e ativar os receptores PAR-1, PAR-2 e PAR-4; todavia, apresenta alguma seletividade para o receptor PAR-2 (Nystedt *et al.*, 1994; Molino *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998; Cottrell *et al.*, 2004). Embora a função fisiológica da tripsina seja principalmente relacionada à digestão de proteínas, descobertas recentes sugerem que esta enzima é a principal ativadora endógena do receptor PAR-2 no intestino e no pâncreas (Ossovskaya e Bunnnett, 2004). A tripsina tem sido utilizada em inúmeros trabalhos da literatura que procuram caracterizar o envolvimento do receptor PAR-2 em diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro*, apresentando maior potência que outros agonistas empregados nas mesmas condições (Steinhoff *et al.*, 2000; 2003; Vergnolle *et al.*, 2001; Amadesi *et al.*, 2004; 2006). Além disso, o receptor PAR-2 pode ser ativado por outras proteinases (Tabela 1), entre elas destacam-se a triptase (liberada por mastócitos) e os fatores VIIa e Xa da coagulação (Corvera *et al.*, 1997; Molino *et al.*, 1997; Bono *et al.*, 2000; Camerer *et al.*, 2000). As proteases clivam este receptor entre os aminoácidos arginina (posição 36) e serina (posição 37) para expor o novo domínio N-terminal (para revisão, ver Cottrell *et al.*, 2003).

Com exceção do receptor PAR-3, existem agonistas peptídicos sintéticos e seletivos, compostos por 5 ou 6 aminoácidos, que mimetizam as ações das proteases sobre os receptores PAR e também podem gerar respostas intracelulares (Figura 1 e Tabela 1) (para revisão, ver Barry *et al.*, 2006). Os fragmentos peptídicos SFNGGP-NH<sub>2</sub> e TFRGAP-NH<sub>2</sub> foram desenvolvidos como

agonistas para o receptor PAR-3. No entanto, tem sido demonstrado que estes peptídeos também são capazes de ativar PAR-1 e PAR-2 (Barry *et al.*, 2006). Os agonistas sintéticos para os receptores PARs constituem importantes ferramentas farmacológicas que podem ser utilizadas para a caracterização das funções biológicas desencadeadas pela ativação dos diferentes receptores desta família. Os peptídeos SLIGRL-NH<sub>2</sub> e SLIGKV-NH<sub>2</sub>, agonistas seletivos para o receptor PAR-2 de roedores e humanos, respectivamente, tem sido amplamente empregados na caracterização do envolvimento deste receptor em diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo* (Steinhoff *et al.*, 2000; 2003; Vergnolle *et al.*, 2001; Amadesi *et al.*, 2004; 2006). As evidências iniciais sugerindo uma possível utilização terapêutica destes peptídeos, como agentes broncodilatadores ou no tratamento de doenças inflamatórias intestinais (Cottrell *et al.*, 2003), levaram a novos estudos de relação estrutura-atividade buscando moléculas mais eficazes como agonistas do PAR-2. No entanto, apesar de inúmeras modificações na estrutura do fragmento SLIGRL-NH<sub>2</sub>, não foram encontradas moléculas mais potentes e seletivas do que este peptídeo (para revisão, ver Barry *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado os mecanismos intracelulares pelos quais os receptores PARs desencadeiam respostas funcionais *in vitro* ou *in vivo*. Os receptores PAR-1 e PAR-2 são os mais estudados e os principais avanços nesta área foram alcançados através do emprego de agonistas preferenciais destes receptores (trombina para o PAR-1, e tripsina ou triptase para o PAR-2), ou pelo uso de agonistas seletivos sintéticos (TFLLR-NH<sub>2</sub> ou SLIGRL-NH<sub>2</sub>, para o PAR-1 e PAR-2, respectivamente). Em conjunto, estes estudos têm demonstrado que a ativação dos receptores PAR resulta na ligação a diferentes proteínas G, com consequente ativação de inúmeras vias de

sinalização intracelular. Os receptores PAR-1 e PAR-2 são preferencialmente acoplados às proteínas  $G_i$ ,  $G_q$  e  $G_{12/13}$ , promovendo ativação direta ou indireta de diversas enzimas de sinalização, tais como fosfatidilinositol-3-quinase ( $PI_3K$ ), fosfolipase C (PLC)- $\beta$ , PLC- $\gamma$ , proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA), e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (para revisão, ver Macfarlane *et al.*, 2001; Cottrell *et al.*, 2003; Steinhoff *et al.*, 2005).

O receptor PAR-2 foi inicialmente isolado e clonado a partir de uma biblioteca genômica de DNA de camundongos e, posteriormente, de uma biblioteca genômica de DNA humano, utilizando uma sonda derivada da sequência do gene para receptor PAR-2 de camundongos (para revisão, ver Metcalfe *et al.*, 2001). Esta proteína é composta por 397 aminoácidos e pode ser encontrada expressa no trato gastrointestinal, pâncreas, rins, fígado, vias aéreas, cérebro e pele, além de diferentes tipos celulares como células epiteliais, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos, células musculares lisas, células endoteliais, leucócitos e neurônios (Tabela 1) (Metcalfe *et al.*, 2001; Cottrell *et al.*, 2003; Vergnolle *et al.*, 2003). Embora as funções fisiológicas relacionadas a ativação deste receptor não estejam completamente compreendidas, importante participação em funções cardiovasculares, respiratórias e gastrintestinais tem sido fortemente sugerida (para revisão, ver Metcalfe *et al.*, 2001; Bucci *et al.*, 2005; Kawabata e Kawao, 2005; Bueno e Fioramonti, 2008). Ademais, muitos estudos em roedores têm demonstrado efeitos pró-inflamatórios e pró-nociceptivos de agonistas para os receptores PAR-2 (para revisão, ver MacFarlane *et al.*, 2001; Cottrell *et al.*, 2003; Vergnolle *et al.*, 2003; Vergnolle, 2005). Uma vez estimulado, o receptor PAR-2 causa vasodilatação, hiperemia, extravasamento plasmático, edema, secreção de citocinas pró-inflamatórias e

migração de células polimorfonucleares para o sítio inflamado (Vergnolle, 1999; Vergnolle *et al.*, 1999; Seeliger *et al.*, 2003). Além disso, o receptor PAR-2 está expresso em neurônios sensoriais peptidérgicos, podendo promover ativação e/ou sensibilização de fibras aferentes sensoriais primárias, com consequente liberação de neuropeptídeos, tais como SP e CGRP, ou de aminoácidos excitatórios, levando ao quadro de inflamação neurogênica, que contribui para os fenômenos de nocicepção e hiperalgesia (Steinhoff *et al.*, 2000; Vergnolle *et al.*, 2001; 2003; Hoogerwerf *et al.*, 2001; Amadesi *et al.*, 2004; Vergnolle, 2005; Obreja *et al.*, 2006; Paszcuk *et al.*, 2008).

A inflamação neurogênica é caracterizada por um processo inflamatório decorrente da liberação de substâncias a partir de terminações periféricas de neurônios sensoriais (para revisão, ver Holzer, 1998; Richardson e Vasko, 2002; Peters *et al.*, 2006; Zegarska *et al.*, 2006). Estas substâncias, depois de liberadas, atuam de forma parácrina sobre células periféricas, tais como mastócitos, queratinócitos, neurônios e células musculares lisas, promovendo inflamação, a qual é caracterizada por calor e rubor (secundários à vasodilatação), tumor (secundário ao extravasamento plasmático) e hipersensibilidade (secundária as alterações na excitabilidade de neurônios sensoriais) (Richardson e Vasko, 2002; Peters *et al.*, 2006). Os neurônios sensoriais de pequeno e médio diâmetro, sensíveis à capsaicina, e que expressam o receptor TRPV1, são de grande importância na gênese da inflamação neurogênica, uma vez que produzem e liberam numerosos mediadores que podem contribuir para este processo, tais como glutamato, PGs e neuropeptídeos. Muitas evidências suportam a noção de que os neuropeptídeos, SP e CGRP, são os principais responsáveis pela inflamação

neurogênica (Holzer *et al.*, 1998). Estes neurotransmissores estão localizados em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG) que dão origem às fibras A $\delta$  e C. A estimulação de fibras C libera os neuropeptídeos, SP e CGRP, periféricamente (liberação antidrômica) e na medula espinhal (liberação ortodrômica), enquanto que a destruição destas fibras pelo tratamento neonatal com capsaicina é capaz de depletar o conteúdo destes peptídeos (Holzer, 1998). Periféricamente, a liberação de CGRP promove dilatação arteriolar e hiperemia, através da ativação do receptor CGRP<sub>1</sub>. Já, a SP ativa receptores NK<sub>1</sub> em células endoteliais e vênulas pós-capilares, induzindo extravasamento plasmático e edema, bem como degranulação de mastócitos. A liberação central destes neuropeptídeos pode sensibilizar neurônios ascendentes, contribuindo para a hipersensibilidade (Zegarska *et al.*, 2006).

Um membro relativamente novo e importante da inflamação neurogênica é o receptor TRPV1. Este receptor é um canal catiônico não-seletivo, operado por ligante, presente em fibras A $\delta$  e C (Caterina *et al.*, 1997) e, quando ativado, pode levar à liberação de neuropeptídeos (Richardson e Vasko, 2002; Zegarska *et al.*, 2006). O TRPV1 pode ser ativado por vários estímulos, incluindo calor, prótons, mediadores lipídicos, como produtos da via da lipoxigenase e anandamida, e por compostos vanilóides, tais como a capsaicina. Além disso, este receptor pode ser sensibilizado por alguns mediadores inflamatórios, como PGs, ATP, 5-HT, proteases e BK (para revisão, ver Caterina e Julius, 2001).

Steinhoff e colaboradores (2000) demonstraram que o edema de pata induzido em roedores pelo agonista seletivo para o receptor PAR-2, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, é dependente da ativação de neurônios sensoriais e da liberação



concomitante de SP e CGRP e que tais efeitos são ausentes em animais com deleção do gene para o receptor PAR-2 (PAR-2<sup>-/-</sup>), para NK<sub>1</sub> ou para o precursor da SP. Além disso, a inflamação cutânea induzida pela tripsina em ratos apresenta importante participação de mediadores da inflamação neurogênica (Obreja *et al.*, 2006). Vergnolle e colaboradores (2001) verificaram que a administração intraplantar de tripsina ou do peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> induz a expressão de c-fos em neurônios espinhais de roedores, resultando em hiperalgesia térmica e mecânica, as quais são ausentes em animais nocaute para o PAR-2 ou para o precursor dos neuropeptídeos SP e neurocinina (NK) A. Corroborando estes achados, Amadesi e colaboradores (2004; 2006) demonstraram que a ativação do receptor PAR-2 pode sensibilizar o receptor TRPV1, através de mecanismo dependente das proteínas PKC $\epsilon$  e PKA, promovendo a liberação de SP e CGRP.

A hipótese a respeito da participação de proteases em condições pruriginosas é relativamente antiga. Já se sabe, há algumas décadas, que a papaína e a mucunaína, proteases presentes no mamão e no cowhage, respectivamente, são capazes de causar coceira (Shelley e Arthur, 1955; Hägermark, 1973). No entanto, apenas recentemente, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno começaram a ser explorados, revelando uma importante contribuição dos receptores PAR-2 para os eventos pruriginosos. Inicialmente, foi demonstrado que a injeção intradérmica de tripsina em humanos saudáveis causa sensação de coceira, sem a presença de eritema ou edema, sugerindo o envolvimento do receptor PAR-2 nesta resposta (Thomsen *et al.*, 2002). De modo relevante, Steinhoff e colaboradores (2003) demonstraram pela primeira vez o envolvimento do receptor PAR-2 na coceira em pacientes com dermatite

atópica, sugerindo uma nova via para o prurido na pele de humanos. A injeção i.d. do agonista seletivo para o PAR-2, peptídeo SLIGKV-NH<sub>2</sub>, causou sensação de coceira quando aplicado próximo às lesões de pacientes atópicos (Steinhoff *et al.*, 2003). Estes autores também verificaram aumento da liberação de triptase na pele destes indivíduos, bem como a expressão aumentada do receptor PAR-2 em queratinócitos, vasos sanguíneos e fibras aferentes primárias (Steinhoff *et al.*, 2003). Confirmando estes dados, foi previamente sugerido que o agonista endógeno do PAR-2, triptase, pode ativar queratinócitos na pele inflamada de pacientes com dermatite atópica ou psoríase (Steinhoff *et al.*, 1999). Além disso, foi sugerido recentemente que a mucunáina, causa coceira através da ativação do receptor PAR-2 (Reddy *et al.*, 2008). Por fim, a injeção i.d. de agonistas para o receptor PAR-2, triptase ou peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub>, causa comportamento sugestivo de prurido no dorso de camundongos (Shimada *et al.*, 2006; Ui *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007). Recentemente, Nakano e colaboradores (2008) sugeriram a existência de neurônios no corno da raiz dorsal de camundongos, que estão associados com a coceira mediada pela ativação do receptor PAR-2, e que parecem diferir daqueles neurônios que medeiam o comportamento pruriginoso induzido pela histamina. Apesar das evidências acerca do envolvimento do receptor PAR-2 em eventos pruriginosos, tanto em humanos quanto em roedores, os mecanismos relacionados à participação deste receptor em tal fenômeno não foram investigados até o momento.

Alguns trabalhos têm sugerido o envolvimento do sistema calicreína-cininas na patofisiologia da coceira (Rajakulasingam *et al.*, 1991; Hayashi e Majima, 1999; Schmelz *et al.*, 2003; Hosogi *et al.*, 2006). As cininas são peptídeos

biologicamente ativos formados a partir de  $\alpha$ -globulinas, conhecidas como cininogênios, através da ação proteolítica de calicreínas, em resposta a estímulos fisiológicos ou durante o processo inflamatório (Proud e Kaplan, 1988; para revisão, ver Marceau e Regoli, 2004). Uma vez liberadas, as cininas exercem vários efeitos biológicos, incluindo vasodilatação, hiperemia, redução da pressão sangüínea, aumento da permeabilidade vascular e sensibilização de fibras aferentes sensoriais do tipo A $\delta$  e C, com consequente liberação de neuropeptídeos, tais como SP e CGRP, ou de aminoácidos excitatórios (Dendorfer *et al.* 1999; Calixto *et al.*, 2000; 2001). As ações das cininas são mediadas através de dois subtipos de receptores acoplados à proteína G, denominados receptores B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R) e B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) para as cininas (Regoli e Barabé, 1980; Marceau e Regoli, 2004). Apesar da baixa homologia na sequência de aminoácidos apresentada pelos B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R, aproximadamente 36% (dependendo da espécie estudada) (Hess, 1997), as vias de transdução acionadas pelos dois tipos de receptores são semelhantes. Os B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R são preferencialmente acoplados a proteínas G $\alpha_i$  e G $\alpha_q$  (Liao e Homcy, 1993) e suas ativações podem estar relacionadas à estimulação direta ou indireta de diversas vias de sinalização intracelular (Schanstra *et al.*, 1999; Liebmann e Böhmer, 2000; Liebmann, 2001).

A principal diferença entre os B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R está no padrão de expressão destas proteínas. Os B<sub>2</sub>R são expressos de forma constitutiva em vários tecidos (Dendorfer *et al.*, 1999; Marceau e Regoli, 2004), enquanto que os B<sub>1</sub>R estão geralmente ausentes em condições fisiológicas, sendo rapidamente expressos em diversos tipos celulares após longos períodos de incubação *in vitro*, trauma tecidual ou infecções, ou após o tratamento com endotoxinas bacterianas,

adjuvante de Freund, citocinas pró-inflamatórias, luz ultravioleta, estresse térmico, dentre outros estímulos (Marceau *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2000; 2001; 2004). Dessa forma, a maioria das ações fisiológicas das cininas é mediada pelos B<sub>2</sub>R, enquanto que os B<sub>1</sub>R normalmente amplificam e perpetuam a sinalização iniciada pela estimulação dos B<sub>2</sub>R (Marceau *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2000; 2001; 2004).

No entanto, a presença constitutiva do B<sub>1</sub>R em fibras aferentes nociceptivas e diferentes estruturas do SNC de humanos, macacos e roedores tem sido demonstrada (para revisão ver Calixto *et al.*, 2004). A expressão constitutiva do RNA mensageiro (RNAm) ou da proteína para o B<sub>1</sub>R foi detectada no DRG ou ganglio trigêmio de roedores e macacos, predominantemente em neurônios de pequeno diâmetro, co-localizados com CGRP e isolectina B<sub>4</sub> (Seabrook *et al.*, 1997; Wothersponn e Winter, 2000; Ma *et al.*, 2001; Shughrue *et al.*, 2003). Além disso, a presença constitutiva do RNAm e da proteína do B<sub>1</sub>R foi verificada na medula espinhal de roedores, macacos e humanos, confinados aos terminais de fibras aferentes primárias (Wothersponn e Winter, 2000; Ma e Heavens, 2001; Shughrue *et al.*, 2003). Porém, estes receptores não parecem ser funcionais, pois estudos *in vitro* demonstram que agonistas para o B<sub>1</sub>R não são capazes de ativar diretamente terminais periféricos ou corpos celulares de neurônios sensoriais (Davis *et al.*, 1996; Seabrook *et al.*, 1997; Brand *et al.*, 2001). Ainda, níveis basais de expressão do B<sub>1</sub>R em estruturas relacionadas à transmissão e modulação sensorial, tais como córtex somatosensorial, amígdala, hipocampo, hipotálamo e tálamo, foram encontrados (Ongali *et al.*, 2003; Shughrue e Austin, 2003; Prediger *et al.*, 2008; Quintão *et al.*, 2008). Embora a função deste receptor em estruturas centrais

ainda não seja completamente compreendida, muitos estudos têm sugerido uma forte relação com os fenômenos de nocicepção e hiperalgesia (Corrêa e Calixto, 1993; Sufka e Roach, 1996; Ferreira *et al.*, 2001; 2002; Beirith *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2004, Quintão *et al.*, 2008). De fato, a BK está entre os algógenos endógenos mais potentes, e o seu papel, bem como os dos B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R, em processos nociceptivos tem sido extensivamente revisado (Couture *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2000; 2001; 2004).

Em relação ao envolvimento do sistema calicreínas-cininas na coceira, sabe-se que a administração intranasal dos agonistas de B<sub>2</sub>R, calidina e BK, mas não de des-Arg<sup>9</sup>- BK (DABK), agonista preferencial de B<sub>1</sub>R, causa sensação de coceira em alguns pacientes com rinite alérgica (Rajakulasingam *et al.*, 1991). No entanto, em uma segunda publicação, estes mesmos autores relataram que a administração intranasal de BK em voluntários sadios causa dor ao invés de coceira, quando comparada aos efeitos da aplicação de histamina nestes mesmos indivíduos (Rajakulasingam *et al.*, 1993). Recentemente, Hosogi e colaboradores (2006) demonstraram que a aplicação de BK por iontoforese, em locais próximos as lesões de pacientes com dermatite atópica, causa sensação de coceira, um efeito que não é prevenido pelo tratamento com o anti-histamínico (H<sub>1</sub>) olopatadina. Ademais, foi demonstrado anteriormente, por meio de estudos de microneurografia, que a aplicação de BK na pele de voluntários sadios pode ativar neurônios pruriceptivos, ou seja, fibras sensíveis à histamina e insensíveis a estímulos mecânicos, além de causar sensação de coceira em alguns indivíduos, embora a sensação de dor tenha sido mais frequentemente relatada (Schmelz *et al.*, 2003). A partir de experimentos *in vitro* com preparação de nervos isolados da pele de ratos, outro estudo sugeriu que a BK poderia

contribuir para a coceira em condições inflamatórias, por sensibilizar fibras nervosas periféricas à histamina (Koppert *et al.*, 1993 citado por Hosogi *et al.*, 2006). Hayashi e Majima (1999), em estudos com roedores, demonstraram que o comportamento pruriginoso, induzido pela administração i.d. de deoxicolato de sódio no dorso de camundongos depende de componentes do sistema calicreínas-cininas. O tratamento com antagonistas seletivos de B<sub>2</sub>R (Hoe 140 ou FR173657), mas não com o antagonista seletivo de B<sub>1</sub>R (DALBK), preveniu os acessos de coceira induzidos pelo deoxicolato de sódio em camundongos. Além disso, ratos deficientes em cininogênio (B/N-Katholiek) apresentaram redução do comportamento pruriginoso induzido pelo deoxicolato, quando comparados com ratos normais (B/N-Kitasato) (Hayashi e Majima, 1999).

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na neurotransmissão da coceira obtidos na última década, ainda parece faltar muito para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes para o tratamento de condições pruriginosas resistentes à farmacoterapia atual. Neste sentido, melhor compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na transmissão do prurido torna-se extremamente relevante, especialmente dos mecanismos relacionados ao prurido causado, ou intensificado, pela liberação de proteases e consequente ativação do receptor PAR-2. Sendo assim, o presente estudo procurou caracterizar os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos no comportamento de coçar induzido pela administração i.d. de agonistas do receptor PAR-2, quando administrados no dorso de camundongos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos farmacológicos envolvidos no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2, quando administrados por via intradérmica na região dorsal em camundongos.

### **Objetivos específicos**

- Verificar o efeito comportamental desencadeado pela administração intradérmica de tripsina ou do fragmento peptídico SLIGRL-NH<sub>2</sub>, agonistas do receptor PAR-2, no dorso de camundongos, em comparação ao comportamento induzido pela administração de tripsina inativa, fragmento inverso LRGILS-NH<sub>2</sub>, ou composto 48/80;
- Analisar o envolvimento do sistema opioidérgico, de corticóides e prostanóides no comportamento de coçar e na nocicepção declarada induzidos pela tripsina em camundongos, através do bloqueio farmacológico;
- Avaliar a participação de mastócitos, histamina, serotonina e proteases, no comportamento de coçar induzido por ativadores do PAR-2, por meio do emprego de distintas ferramentas farmacológicas;
- Analisar o envolvimento de fibras sensíveis à capsaicina na resposta comportamental induzida pelos agonistas do PAR-2, pelo emprego de diferentes estratégias farmacológicas;

- Investigar a influência do receptor TRPV1 sobre a resposta pruriginosa induzida por agonistas do PAR-2, através do seu bloqueio farmacológico ou pelo uso de animais com deleção gênica para este o receptor;
- Caracterizar o envolvimento dos neuropeptídeos, substância P, CGRP ou neurocininas A e B, na resposta pruriginosa induzida pelos ativadores do PAR-2, através do uso de antagonistas seletivos;
- Analisar a participação das cininas e de mecanismos operados por B<sub>2</sub>R ou B<sub>1</sub>R para cininas no comportamento pruriginoso induzido pelos agonistas do PAR-2, por meio do emprego de antagonistas seletivos ou de animais nocaute para estes receptores.



## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### **Animais**

Foram utilizados camundongos machos das linhagens Swiss (30-40 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e, C57BL/6 (25-30g), criados no biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) do Departamento de Farmacologia/CCB-UFSC. Além disso, foram utilizados animais nocaute para os B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) ou B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) das cininas, criados no biotério do LAFEX. As matrizes dos animais nocautes para os receptores cininérgicos foram gentilmente cedidas pelo Professor João Bosco Pesquero (Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo). A deleção da sequência codificadora dos genes para o B<sub>1</sub>R (Pesquero *et al.*, 2000) ou B<sub>2</sub>R (Rupniak *et al.*, 1997) foi realizada de acordo com metodologias descritas na literatura. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 1 °C), umidade (60 – 80 %) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12 horas) controladas. Água e comida foram providas *ad libitum*, exceto durante os procedimentos experimentais.

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* dos Estados Unidos da América (*NIH Publication No. 85-23*, revisado em 1996). Todos os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo nº PP00032).

Em alguns experimentos foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos e fêmeos (25-30 g), selvagens ou com deleção gênica do

receptor TRPV1 (TRPV1<sup>-/-</sup>). Estes experimentos foram realizados no laboratório da Dr<sup>a</sup>. Susan D. Brain (*Cardiovascular Division, Waterloo Campus, King's College London, Londres, Inglaterra*). Os animais selvagens e nocaute para o receptor TRPV1 foram gentilmente doados pela *Merck Sharp and Dohme (Harlow, UK)*. Os animais TRPV1<sup>-/-</sup> foram gerados como descrito por Caterina *et al.* (2000). Estes experimentos foram conduzidos de acordo com o *Animals (Scientific Procedures) Act (1986)* e aprovados previamente pelo Comitê de Ética daquela instituição.

### **Comportamento de coçar em camundongos**

O comportamento de coçar induzido por agentes pruriginosos em camundongos foi realizado de acordo com o método proposto originalmente por Kuraishi e colaboradores (1995), com pequenas modificações (Hayashi e Majima, 1999). Dois dias antes da realização dos experimentos, os animais foram tricotomizados na região dorsal do pescoço (área de aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup>) com o auxílio de um cortador elétrico (Panasonic® ER506 k). Para facilitar o procedimento, os animais foram levemente anestesiados com isoflurano (2% em 100% de O<sub>2</sub>, durante 3 min.). O teste do comportamento de coçar foi realizado em funis de vidro invertidos (15 a 20 cm de diâmetro), posicionados em frente a um espelho em ângulo de 75°, para facilitar a completa visualização dos animais. Por pelo menos 30 min antes da injeção do estímulo pruriginoso, os animais foram habituados dentro do aparato experimental. Após este período de habituação, cada animal foi removido brevemente e injetado por via i.d., na região dorsal do pescoço, com 50 µl de salina (NaCl 0,9 %) contendo: tripsina (30–500 µg/sítio, i.d.), o peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (25–100 µg/sítio, i.d.), deoxicolato de

sódio (100 µg/sítio, i.d.), cloroquina (200 µg/sítio, i.d.), ou composto 48/80 (C48/80; 10 µg/sítio, i.d.). Em alguns experimentos, afim de verificar um possível efeito inespecífico dos agonistas do PAR-2 sobre o comportamento de coçar, alguns grupos de animais receberam salina (50 µl/sítio, i.d.) contendo: tripsina (200 µg/sítio, i.d.) inativada pelo calor (5 min à 100 °C) ou o fragmento inativo LRGILS -NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). Os animais controle receberam somente salina (50 µl/sítio, i.d.). Imediatamente após a injeção dos estímulos, os animais foram recolocados sob o funil de vidro invertido e observados durante o período de 40 min. Com o auxílio de um contador manual, o comportamento de coçar foi quantificado pela contagem do número de acessos de coceira, com movimentação das patas dianteiras (~10-20% da reposta) e traseiras (~80-90% da reposta), dirigidas a proximidades da região injetada. Para as patas dianteiras, foram considerados somente os acessos de coceira atrás da orelha (região do pescoço), mas não sobre a orelha ou a face. Os resultados foram expressos como número de acessos de coceira em 40 min ou a cada 10 min, conforme especificado.

### **Nocicepção espontânea induzida pela tripsina em camundongos**

O teste de nocicepção espontânea induzido pela tripsina em camundongos foi realizado de acordo com o método proposto por Paszcuk e colaboradores (2008). O teste de nocicepção espontânea foi realizado em funis de vidro invertidos (15 a 20 cm de diâmetro), posicionados em frente a um espelho em ângulo de 75°, para facilitar a completa visualização dos animais. Por pelo menos 30 min antes da injeção de tripsina, os animais foram habituados dentro do aparato experimental. Após este período de habituação, cada

animal foi removido brevemente e injetado por via intraplantar (i.pl.), na pata direita traseira, com 20 µl de salina (NaCl 0,9 %) contendo tripsina (300 µg/pata, i.pl.). Os animais controle receberam o mesmo volume de salina (20 µl/pata, i.pl.). Os camundongos foram observados individualmente, imediatamente após a injeção de tripsina, por um período de 10 min. O tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada (*licking*) foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção espontânea.

## **Vias de administração**

### 1. Administração intratecal (i.t.) de drogas

A administração de drogas através da via i.t. foi realizada de acordo com o método descrito por Hylden e Wilcox (1980), com algumas modificações. As injeções foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos. Uma agulha conectada a uma microseringa (25 µl), por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele, fixando-se entre as vértebras no espaço subdural entre os segmentos espinhais L5-L6, para a administração de um volume de 5 µl das drogas ou veículo.

### 2. Administração intracerebroventricular (i.c.v.) de drogas

A administração de drogas através da via i.c.v. foi realizada de acordo com o método descrito por Laursen e Belknap (1986). Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano (2% em 100% de O<sub>2</sub>, durante 3 min.) e uma agulha (30 G; 4,2 mm de comprimento) conectada a uma microseringa (25 µl) por intermédio de uma cânula de polietileno foi inserida diretamente no

ventrículo lateral (coordenadas do bregma: 1 mm lateral; 1 mm rostral; 3 mm vertical) para a administração lenta (em 1 min.) de um volume de 5 µl das drogas ou veículo.

### 3. Protocolo geral de administração de drogas

De acordo com cada protocolo experimental, diferentes grupos de animais foram previamente tratados, ou co-tratados, com diversos inibidores ou antagonistas, por diferentes vias de administração, antes da aplicação dos estímulos pruriginosos ou nociceptivos, ou co-injetados por via i.d. com os pruritógenos. Os animais controle receberam o veículo correspondente a cada droga, de acordo com o protocolo utilizado. Os tratamentos pelas vias intraperitoneal (i.p.) e subcutânea (s.c.) foram realizados 30 min antes da injeção dos estímulos, com exceção da dexametasona, que foi administrada 4 h antes, e do cromoglicato de sódio, que foi administrado durante alguns dias antes dos experimentos (ver detalhes abaixo). As drogas administradas por via oral (v.o.) foram aplicadas 1 h antes. Os tratamentos endovenoso (e.v.), i.t. e i.c.v. foram realizados 15 mins antes dos estímulos. Os tratamentos e.v. foram realizados por injeção retro-orbital. Já os tratamentos i.d. foram realizados como co-injeção com o estímulo utilizado, com exceção do composto 48/80 (tratamento crônico), que foi administrado durante alguns dias antes dos experimentos (ver detalhes abaixo).

## **Análise dos mecanismos farmacológicos envolvidos no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos**

### 1. Verificação do envolvimento da atividade proteolítica da tripsina no comportamento de coçar induzido por esta enzima em camundongos

Para avaliar a importância da atividade serino-proteolítica da tripsina sobre o comportamento de coçar induzido por esta enzima (200 µg/sítio, i.d.), camundongos Swiss foram co-tratados por via i.d., juntamente com o estímulo pruriginoso, com os seguintes inibidores: aprotinina (100 µg/sítio, i.d.), inibidor não-seletivo de serino-proteases, e com o inibidor de tripsina de *Phaseolus limensis* (lima bean) (100 e 500 µg/sítio), inibidor específico de tripsina. As doses dos inibidores foram selecionadas a partir de experimentos pilotos (dados não mostrados).

### 2. Análise da participação do receptor PAR-2 no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos

A verificação do envolvimento do receptor PAR-2 na resposta pruriginosa causada pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) em camundongos Swiss, foi realizada através do emprego do antagonista seletivo e peptídico para este receptor, FSLLRY-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio), que foi co-injetado por via i.d. juntamente com os estímulos pruriginosos. A dose do FSLLRY-NH<sub>2</sub> foi selecionada a partir da literatura (Shimada *et al.*, 2006).

Além disso, a participação do PAR-2 nas respostas induzidas pelos agonistas foi confirmada através da dessensibilização prévia do receptor PAR-2, obtida pela administração repetida de tripsina (200 µg/sítio) por via i.d. na

região dorsal do pescoço, por 7 dias consecutivos, antes da realização dos experimentos.

### 3. Avaliação do envolvimento do sistema opioidérgico no comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina

Afim de verificar o envolvimento do sistema opioidérgico no comportamento de coçar desencadeado pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) em camundongos *Swiss*, diferentes grupos de animais foram pré-tratados por via i.p. com morfina (5 mg/kg) ou naloxona (1 mg/kg), agonista e antagonista não seletivos dos receptores opióides, respectivamente, administrados 30 min antes do estímulo pruriginoso. Os animais controle receberam somente o veículo (salina, NaCl à 0,9%) por via i.p. (10 ml/kg, 30 min).

O envolvimento do sistema opioidérgico na nocicepção espontânea induzida pela tripsina foi verificado pelo pré-tratamento i.p. com morfina (5 ou 10 mg/kg) ou naloxona (1 mg/kg), administrados 30 min antes da injeção i.pl. de tripsina (300 µg/pata). Os animais controle receberam somente o veículo (salina) por via i.p. (10 ml/kg, 30 min).

As doses de todas as drogas foram selecionadas a partir de dados da literatura (Yamaguchi *et al.*, 1999; Mendes *et al.*, 2000; Umeuchi *et al.*, 2003; Trentin, 2006).

### 4. Verificação do efeito de anti-inflamatórios esteroidal e não-esteroidais sobre o comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina

O efeito de corticóides sobre as repostas pruriginosas induzidas pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) em

**camundongos** Swiss, foi verificado através do pré-tratamento por via s.c. com dexametasona (0,5 mg/kg), 4 h antes do estímulo pruriginoso. Os animais controle receberam solução salina (10 ml/kg, s.c., 4 h). Em outro grupo experimental, após 4 h do tratamento s.c. com dexametasona (0,5 mg/kg), ou salina (10 ml/kg), os animais receberam injeção i.pl. de tripsina (300 µg/sítio, i.pl.) na pata direita, para avaliação do comportamento nociceptivo.

A participação de produtos da via do ácido araquidônico no comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) foi avaliada pelo pré-tratamento com os inibidores seletivos das enzimas COX-1, SC560 (5 mg/kg), ou COX-2, celecoxibe (10 mg/kg), administrados pelas vias i.p. (30 min antes) e v.o. (1 h antes), respectivamente. Os animais controle receberam os respectivos veículos: salina com 1% de Tween-80 (10 ml/kg, i.p., 30 min) ou somente salina (10 ml/kg, v.o., 1 h). Para avaliação do envolvimento de prostanoídes no comportamento nociceptivo induzido pela tripsina (300 µg/sítio, i.pl.), outros grupos de animais foram pré-tratados com celecoxibe (10 mg/kg, v.o.), ou salina 10 ml/kg, v.o.), 1 h antes da injeção i.pl. da enzima.

As doses de todas as drogas foram selecionadas a partir de trabalhos da literatura (Siqueira-Júnior *et al.*, 2003; Takeeda *et al.*, 2003; Trentin *et al.*, 2006).

##### 5. Avaliação da participação de mastócitos no comportamento de coçar induzido pela tripsina em camundongos

Para verificar a participação de mastócitos no comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.), camundongos Swiss foram pré-tratados por via i.d. na região dorsal, com o degranulador de mastócitos, o composto 48/80, durante 4 dias (1, 3, 10 e 10 µg/sítio, no 1º, 2º, 3º e 4º dia,



respectivamente), para promover a depleção dos grânulos intracelulares. Outro grupo experimental recebeu cromoglicato de sódio (8 mg/kg, i.p.), um estabilizador da membrana de mastócitos, por via i.p. uma vez ao dia, durante 6 dias. Os animais controle receberam salina por via i.d. (50 µl) ou i.p. (10 ml/kg). As doses de todas as drogas foram selecionadas a partir de dados da literatura (Samoszuk e Corwin, 2003; Piovezan *et al.*, 2004).

#### 6. Verificação do envolvimento de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2

O possível envolvimento da histamina no comportamento pruriginoso induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) em camundongos Swiss, foi avaliado pelo pré-tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores histaminérgicos: H<sub>1</sub>, pirilamina (10 mg/kg, s.c.) ou loratadina (10 mg/kg, s.c.), H<sub>2</sub>, cimetidina (20 mg/kg, s.c., 30 min) ou ranitidina (10 mg/kg, s.c.), e H<sub>3</sub>, iodofenpropite (10 mg/kg, i.p.), ou ainda pelo emprego do antagonista não-seletivo de receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, tioperamida (20 mg/kg, i.p.), administrados 30 min antes dos estímulos. Os animais controle receberam salina por via s.c. ou i.p. (10 ml/kg, 30 min). Para avaliação do comportamento nociceptivo, outros grupos de animais foram pré-tratados por via i.p. com iodofenpropite (10 mg/kg, 30 min), tioperamida (20 mg/kg, 30 min) ou salina (10 ml/kg, 30 min), e injetados por via i.pl. com tripsina (300 µg/sítio).

A participação de receptores serotoninérgicos no comportamento pruriginoso induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) foi investigada pelo pré-tratamento s.c. com o antagonista misto de receptores serotoninérgicos/histaminérgicos, ciproeptadina (20 mg/kg), injetados 30 min

antes da aplicação i.d. da enzima. Os animais controle receberam salina por via s.c. (10 ml/kg, 30 min).

As doses de todas as drogas foram selecionadas a partir de dados da literatura (Calixto *et al.*, 2003; Bell *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2004; Trentin, 2006; Dunford *et al.*, 2007).

#### 7. Avaliação da contribuição da liberação de proteases para o comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos

A contribuição de proteases para a coceira induzida pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) foi avaliada pelo pré-tratamento s.c. com o inibidor não seletivo de proteases, gabexato mesilato (10 mg/kg), administrado 30 min antes da aplicação dos estímulos. Os animais controle receberam salina por via s.c. (10 ml/kg, 30 min). As doses de todas as drogas foram selecionadas a partir de dados da literatura (Chen *et al.*, 2006).

#### 8. Participação de fibras sensíveis a capsaicina no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos

O tratamento neonatal com capsaicina, previamente descrito por Gamse (1982) e reproduzido em nosso laboratório (Ferreira *et al.*, 1999), foi empregado com o objetivo de verificar a participação de fibras sensíveis a capsaicina (predominantemente fibras C) no comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) em camundongos. Para isso, camundongos Swiss machos, com dois dias de vida (neonatos), receberam capsaicina (50 mg/kg em 20 µl de veículo), ou somente veículo (salina com 10% de etanol e 10% de Tween-80, 20 µl), por via s.c. na região dorsal. Os animais

foram usados entre 6 e 7 semanas após o tratamento com capsaicina ou veículo (usado como controle).

Outro procedimento farmacológico empregado para avaliar o envolvimento de fibras sensoriais na resposta comportamental de coçar induzida pelo agonista SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.), foi o tratamento com resiniferatoxina (RTX), análogo ultrapotente da capsaicina. Para tanto, camundongos Swiss machos adultos (~30 gramas) receberam por via s.c. três injeções consecutivas de RTX (30, 70 e 100 µg/kg), ou do veículo (salina com 10% de etanol e 10% de Tween-80), em diferentes dias subsequentes. Os animais foram utilizados cinco dias após o último tratamento com RTX ou veículo (Sándor *et al.*, 2007).

Para verificar a eficácia do tratamento neonatal com capsaicina ou RTX sobre a dessensibilização e/ou degeneração de fibras aferentes primárias, 24 horas antes dos experimentos, os animais foram submetidos ao teste de esfregar os olhos (*eye-wiping test*). Para este propósito, uma solução de 20 µl de capsaicina 0,01% foi instilada em ambos os olhos dos animais e o número de movimentos de esfregar foi quantificado durante 1 min. Os animais que esfregaram seus olhos não mais do que cinco vezes foram considerados dessensibilizados e/ou desnervados pelo tratamento com capsaicina ou RTX (Ferreira *et al.*, 1999).

#### 9. Avaliação do envolvimento de receptores TRPV1 no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos

Para verificar o envolvimento de receptores vanilóides na resposta pruriginosa induzida pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.), camundongos Swiss foram pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor TRPV1, SB366791, por via

i.p. (0,5 mg/kg, 30 min). Os animais controle receberam somente o veículo (salina com 2% de etanol) por via i.p. (10 ml/kg, 30 min). Em outro grupo de animais, com o objetivo de verificar a participação do receptor TRPV1 na coceira induzida pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.), camundongos Swiss receberam uma co-injeção i.d. de SB366791 (1 nmol/sítio, i.d.), juntamente com o fragmento peptídico. As doses do antagonista foram selecionadas a partir de dados da literatura (Varga *et al.*, 2005; Claudino *et al.*, 2006).

Afim de confirmar o envolvimento do receptor TRPV1 na coçadura induzida pela ativação do PAR-2, camundongos da linhagem C57BL/6, com deleção gênica para o receptor TRPV1 (TRPV1<sup>-/-</sup>) ou animais selvagens (WT), foram injetados na região dorsal com tripsina (200 µg/sítio, i.d.).

#### 10. Análise do envolvimento de neuropeptídeos no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos

Para analisar a relevância de neuropeptídeos no comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) em camundongos Swiss, os animais foram pré-tratados com os antagonistas seletivos dos receptores NK<sub>1</sub>, FK888 (1 mg/kg), NK<sub>2</sub>, SR48968 (1 mg/kg) ou, NK<sub>3</sub>, SR140821 (3 mg/kg), respectivamente, receptores para SP, NKA e NKB, ou com o antagonista seletivo para o receptor do CGRP, fragmento CGRP<sub>8-37</sub> (0,3 mg/kg), todos administrados por via endovenosa (e.v.), 15 min antes do estímulo pruriginoso. Os animais controle receberam somente salina por via i.p. (10 ml/kg, 30 min). Em outros grupos de animais, os camundongos receberam FK888 (1 nmol/sítio, i.d.) ou o fragmento CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol/sítio, i.d.), co-injetados com o peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). As doses utilizadas para todas as drogas foram selecionadas a partir de

dados da literatura (Veronesi *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 2005; Claudino *et al.*, 2006).

### 11. Caracterização do envolvimento dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> para as cininas no comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos por agonistas do PAR-2 em camundongos

Para caracterizar o envolvimento dos receptores cininérgicos na resposta pruriginosa induzida pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.), camundongos Swiss foram pré-tratados sistemicamente com os antagonistas seletivos para o B<sub>2</sub>R, Hoe 140 (50 nmol/kg, s.c.) ou FR173657 (30 mg/kg, i.p.), ou com os antagonistas seletivos para o B<sub>1</sub>R, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (DALBK; 150 nmol/kg, s.c.) ou SSR240612 (1 mg/kg, s.c.), administrados 30 min antes dos estímulos. Os animais controle receberam os respectivos veículos por via s.c. ou i.p. (10 ml/kg, 30 min).

Com o objetivo de verificar a contribuição dos B<sub>2</sub>R localizados em diferentes sítios na resposta pruriginosa evocada pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.), alguns grupos de camundongos foram tratados com o antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R, Hoe 140, administrado por diferentes vias: i.d. (3 nmol/sítio, co-injetado), i.t. (100 pmol/sítio, 15 min) ou i.c.v. (100 pmol/sítio, 15 min). O envolvimento do B<sub>1</sub>R foi avaliado pelo tratamento por diferentes vias com o antagonista seletivo para este receptor, DALBK: i.d. (0,3 nmol/sítio, co-injetado), i.t. (25 pmol/sítio, 15 min) ou i.c.v. (25 pmol/sítio, 15 min). Os animais controle receberam somente veículo por via i.t. (5 µl/sítio, 15 min) ou i.c.v. (5 µl/sítio, 15 min). As doses de todas as drogas foram selecionadas a partir de dados da literatura (Ferreira *et al.*, 2001; 2002; 2005; 2008; Quintão *et al.*, 2008).

Afim de verificar ou confirmar o envolvimento dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R para as cininas na coceira induzida por diferentes agentes pruriginosos, camundongos da linhagem C57BL/6, com deleção gênica para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) ou B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>), ou animais selvagens (WT), receberam na região dorsal os seguintes agentes: tripsina (200 µg/sítio, i.d.), SLIGRL-NH<sub>2</sub> (200 µg/sítio, i.d.), deoxicolato de sódio (100 µg/sítio), cloroquina (200 µg/sítio), ou composto 48/80 (10 µg/sítio). Por fim, a participação de receptores cininérgicos na nocicepção espontânea induzida pela tripsina (300 µg/sítio, i.pl.) foi verificada pelo emprego de animais com deleção gênica para os B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) ou B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>).

### **Drogas e reagentes**

As seguintes drogas foram utilizadas: tripsina (de pâncreas de porco), inibidor de tripsina de *Phaseolus limensis* (*lima bean*), aprotinina, pirlamina, cimetidina, ranitidina, ciproheptadina, gabexato mesilato, dexametasona, SC560, composto 48/80, cromoglicato de sódio, capsaicina, resiniferatoxina (RTX), fragmento 8-37 do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP<sub>8-37</sub>), des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradicinina (BK) (DALBK), SB366791, todos obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, E.U.A). Celecoxibe foi obtido da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Morfina foi adquirida da Merck AG (Darmstadt, Alemanha). Naloxona obtida da Research Biochemicals International (Natick, MA, E.U.A). Iodofenpropite e tioperamida foram obtidos da Tocris (Ellisville, Missouri, E.U.A). Hoe 140 foi gentilmente doado pela Sanofi-Aventis (Bridgewater, NJ, E.U.A). SSR240612, SR48968 e SR142801 foram gentilmente fornecidos pela Sanofi-Aventis R&D (Moontpellier, França). FR173657 e FK888 foram gentilmente doados pela Fujisawa Pharmaceutical Co. (Osaka, Japão). Os fragmentos peptídicos Phe-Ser-

Leu-Leu-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub> (FSLRLY-NH<sub>2</sub>), Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> (SLIGRL-NH<sub>2</sub>) e Leu-Arg-Gly-Ile-Leu-Ser-NH<sub>2</sub> (LRGILS-NH<sub>2</sub>) foram sintetizados pelo Dr. Luiz Juliano (Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil).

A maioria das drogas, exceto SB366791, SC560, capsaicina, resiniferatoxina e SSR240612, foram diluídas em solução de NaCl 0,9% (p/v) (salina) antes do uso. SB366791 foi diluído em salina com 2% de etanol. SC560 foi diluído em salina com 1% de Tween-80. Capsaicina e resiniferatoxina foram diluídas em salina com 10% de etanol e 10% de Tween-80. SSR240612 foi diluído em salina com 5% de etanol e 5% de Tween-80. Os animais controle receberam o veículo correspondente ao protocolo experimental empregado.

### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 6-10 animais, exceto os valores de DE<sub>50</sub> (doses que produziram 50 % da resposta máxima), que são apresentados como a média geométrica acompanhada de seus respectivos limites de confiança (95 %). As porcentagens de inibição estão apresentadas como a média  $\pm$  erro padrão das inibições obtidas para cada experimento individual. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Dunnett. Valores de P menores que 0,05 (\*P < 0,05) foram considerados como indicativos de significância. O valor de DE<sub>50</sub> foi determinado por regressão linear a partir de experimentos individuais usando o programa GraphPad (San Diego, CA, USA).

## **RESULTADOS**

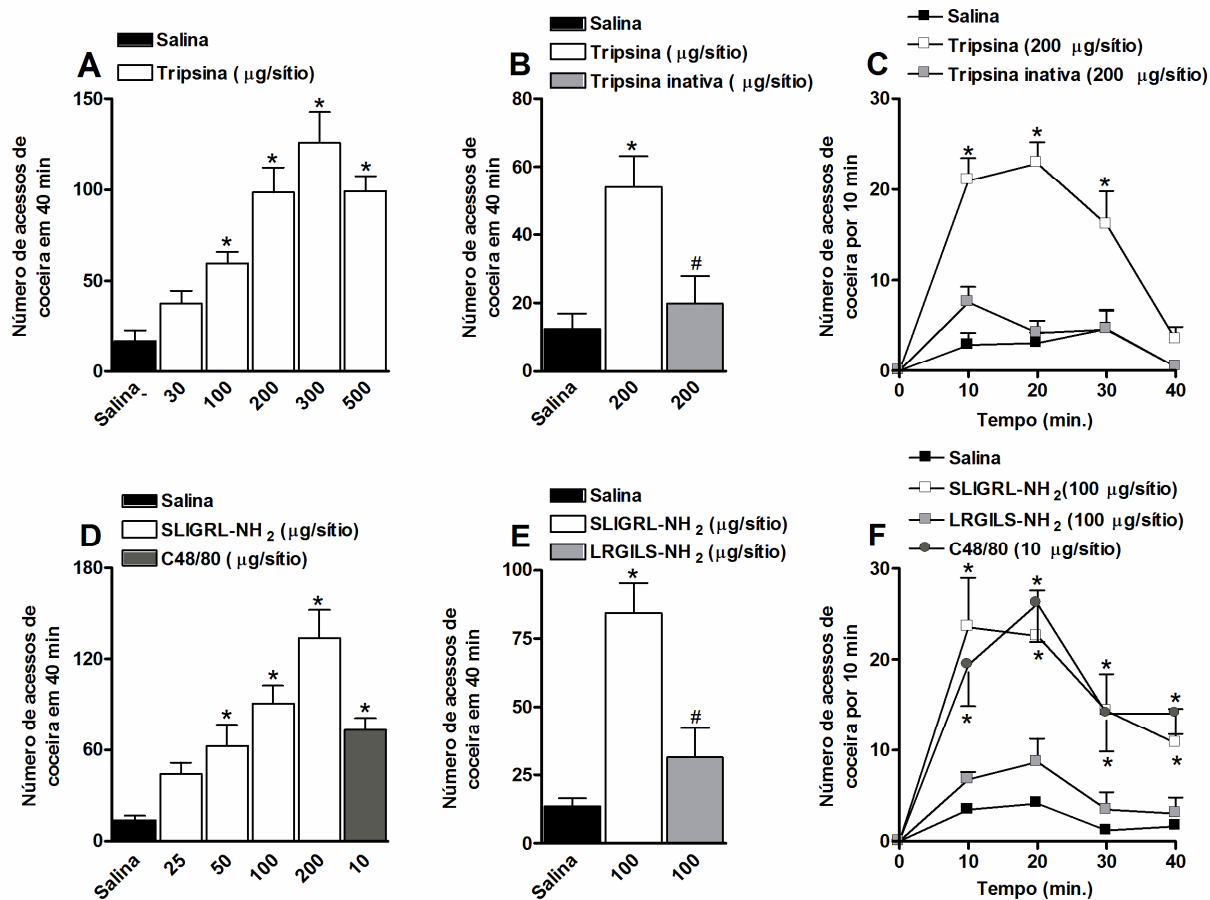
### **Comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos**

Como observado na Figura 2, a administração i.d. de tripsina (30–500 µg/sítio) ou do fragmento peptídico SLIGRL-NH<sub>2</sub> (25–200 µg/sítio) no dorso de camundongos promoveu acessos de coceira de maneira dependente da dose no sítio injetado (Figura 2A e 2B). A dose efetiva de tripsina para esta resposta variou de 100 a 500 µg/sítio, sendo máxima em 300 µg/sítio (Figura 2A). O valor médio estimado para a DE<sub>50</sub> (acompanhado pelo limite de confiança de 95 %) para este efeito foi de 97 (67 – 140) µg/sítio. A dose de 200 µg/sítio foi escolhida para os experimentos seguintes, uma vez que esta foi a dose mais próxima ao valor da DE<sub>50</sub> capaz de induzir efeitos reprodutíveis com menor variação. Os acessos de coceira induzidos pela injeção i.d. de tripsina (200 µg/sítio) manifestaram-se predominantemente nos primeiros 20 min, com redução a partir de 30 min, retornando aos níveis basais em 40 min após a injeção da enzima (Figura 2C). No entanto, a administração de tripsina (200 µg/sítio, i.d.) inativada pelo calor (5 min a 100 °C) não induziu alterações significativas no comportamento de coçar em relação ao grupo salina (Figura 2B). Além disso, o número de acessos de coceira neste grupo foi significativamente menor em comparação aos animais que receberam tripsina não fervida (redução de 82 ± 15%) (Figura 2B).

A dose efetiva do peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> variou entre 50 e 200 µg/sítio, sendo máxima em 200 µg/sítio (Figura 2D). O valor médio estimado para a DE<sub>50</sub> (acompanhado pelo limite de confiança de 95 %) para este efeito foi de 48 (37



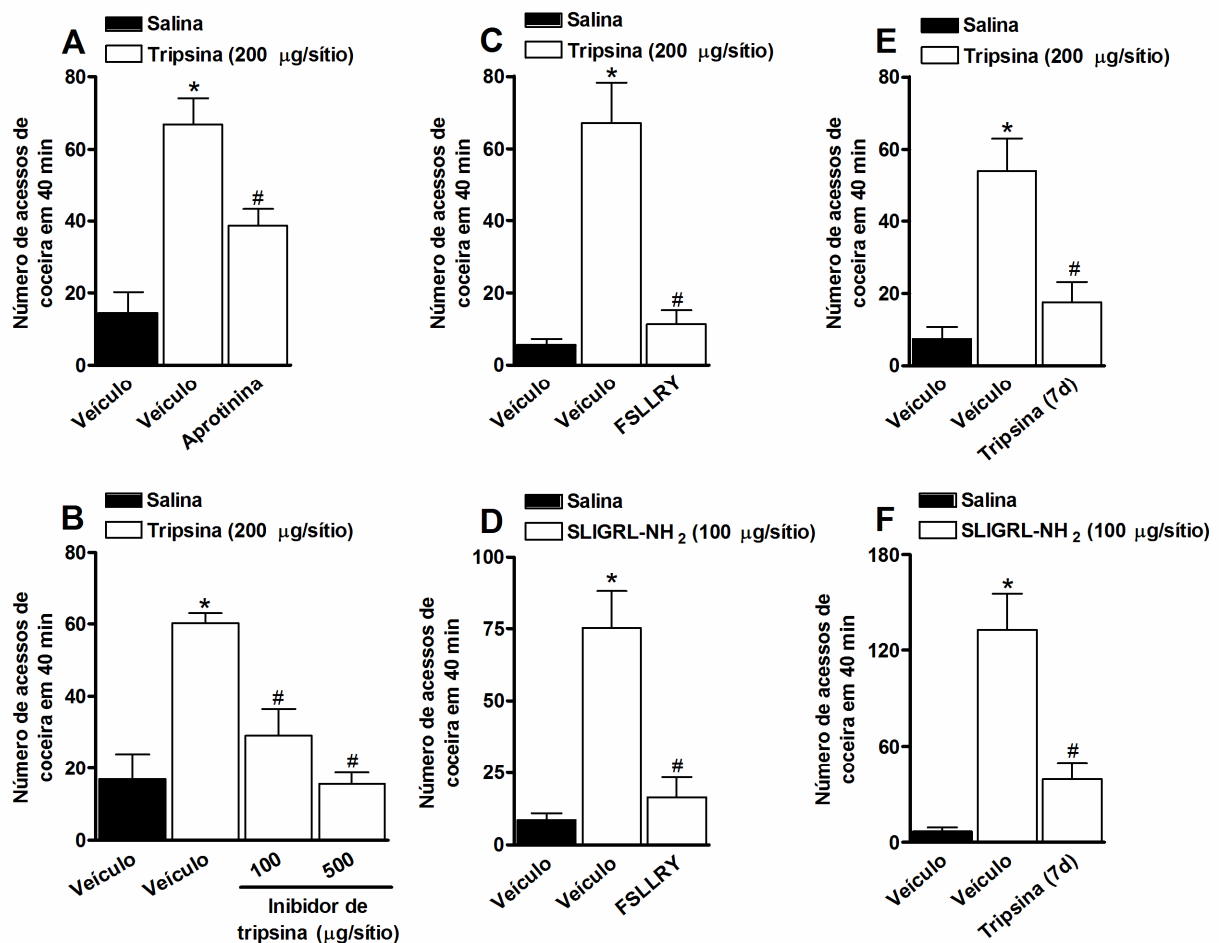
– 74)  $\mu\text{g/sítio}$ . Assim, a dose de 100  $\mu\text{g/sítio}$  foi usada nos experimentos subsequentes. O número de acessos de coceira induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100  $\mu\text{g/sítio}$ ) alcançou pico máximo dentro de 20 min; no entanto, acessos de coceira adicionais também foram observados durante o período restante de observação (Figura 2F). Por outro lado, a administração do peptídeo inativo LRGILS-NH<sub>2</sub> (100  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.) não causou alterações significativas no comportamento de coçar em comparação ao grupo salina (Figura 2E). Além disso, o número de acessos de coceira neste grupo foi significativamente menor quando comparado aos animais que receberam o peptídeo ativo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (redução de  $75 \pm 15\%$ ) (Figura 2E). De maneira interessante, a injeção i.d. do agente degranulador de mastócitos, composto 48/80 (10  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.), também foi capaz de induzir acessos de coceira ao sítio injetado (Figura 2D), apresentando um perfil temporal de resposta similar ao obtido para os agonistas do PAR-2 (Figura 2C e 2F).



**Figura 2** - Comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 ou pelo composto 48/80 em camundongos Swiss. **(A)** Curva dose-resposta para o comportamento de coçar induzido pela tripsina (30-500  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.). **(B)** Efeito da administração i.d. de tripsina (200  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.) inativada pelo calor (5 min à 100°C) sobre o comportamento de coçar. **(C)** Curva tempo-resposta para o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.). **(D)** Curva dose-resposta para o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (25-200  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.). **(E)** Efeito da administração i.d. do peptídeo inativo LRGILS-NH<sub>2</sub> (100  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.) sobre o comportamento de coçar. **(F)** Curva tempo-resposta para o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.) e para o composto 48/80 (10  $\mu\text{g/sítio}$ , i.d.). Cada coluna ou cada ponto da curva representa a média de 6-10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina, \*P<0,05, ou ao grupo controle (tripsina ou SLIGRL-NH<sub>2</sub>), #P<0,05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnet).

A importância da preservação da atividade proteolítica da tripsina sobre o comportamento de coçar, foi confirmada através da co-injeção i.d. de tripsina (200 µg/sítio, i.d.) em associação com aprotinina (100 µg/sítio, i.d.), inibidor não seletivo de serino-proteases, ou com o inibidor de tripsina de *Phaseolus limensis* (lima bean), inibidor específico da tripsina. Os dados da Figura 3 mostram que o co-tratamento com aprotinina reduziu significativamente o comportamento de coçar induzido pela enzima (inibição de  $54 \pm 9\%$ ) (Figura 3A). Do mesmo modo, a co-injeção do inibidor específico da tripsina, na maior dose, aboliu completamente a resposta da tripsina (inibição de  $106 \pm 8\%$ ) (Figura 3B).

A fim de confirmar o envolvimento do receptor PAR-2 na resposta pruriginosa cutânea causada pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.), foi avaliado o efeito da co-injeção i.d. do antagonista peptídico e seletivo para o receptor PAR-2, o FSLLRY-NH<sub>2</sub>. Como esperado, o tratamento com o antagonista FSLLRY-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) reduziu significativamente o número de acessos de coceira induzido por ambos os ativadores do receptor PAR-2, com  $91 \pm 7\%$  de inibição para a tripsina (Figura 3C) e  $88 \pm 10\%$  de inibição para o SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Figura 3D). De maneira similar, a dessensibilização do receptor PAR-2, pela administração repetida de tripsina (200 µg/sítio, i.d.) durante 7 dias antes da realização dos experimentos, promoveu redução significativa do comportamento de coçar induzido tanto pela tripsina (Figura 3E) quanto pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Figura 3F), com inibições de  $80 \pm 12\%$  e  $83 \pm 10\%$ , respectivamente.



**Figura 3** – Envolvimento da atividade proteolítica da tripsina e do receptor PAR-2 no comportamento de coçar induzido pelos agonistas do PAR-2 em camundongos *Sws1*. **(A)** Efeito da co-injeção de aprotinina (100 µg/sítio, i.d.), inibidor não seletivo de serino-proteases, ou **(B)** do inibidor de tripsina de *Phaseolus limensis* (*lima bean*) (100 e 500 µg/sítio, i.d.) sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) em camundongos. **(C)** Efeito da co-injeção do antagonista peptídico e seletivo para o receptor PAR-2, FSLRY-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.), sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou **(D)** pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). **(E)** Efeito da administração repetida de tripsina (200 µg/sítio, i.d., durante 7 dias) sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio) ou **(F)** pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*P<0.05, ou controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), #P<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnet).

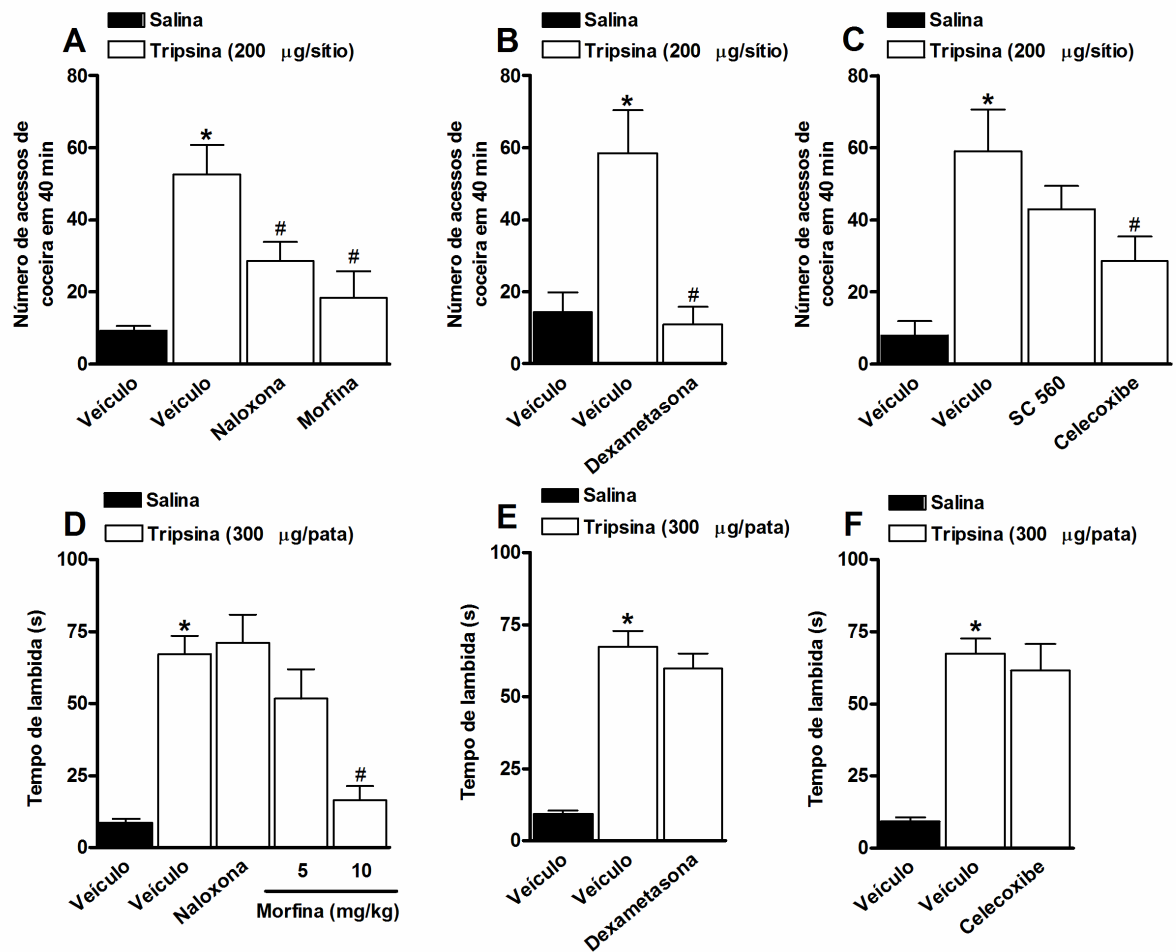
## **Envolvimento do sistema opioidérgico no comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina**

Inicialmente, foi avaliado o envolvimento de receptores opióides no comportamento de coçar e na nocicepção espontânea induzidos pela tripsina, através do uso de agonistas e antagonistas destes receptores. Como demonstrado na Figura 4, camundongos Swiss pré-tratados com morfina (5 mg/kg, i.p., 30 min), agonista não seletivo dos receptores opióides, apresentaram menor número de acessos de coceira após a administração de tripsina (200 µg/sítio, i.d.) (Figura 4A), quando comparados aos animais que receberam somente salina (79 ± 17% de inibição). Além disso, o pré-tratamento com morfina, na dose de 10 mg/kg (i.p., 30 min), mas não na dose de 5 mg/kg (i.p., 30 min), inibiu substancialmente a nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de tripsina (300 µg/pata; 86 ± 8% de inibição) (Figura 4D). Curiosamente, o pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p., 30 min), antagonista não seletivo dos receptores opióides, também foi capaz de prevenir o número de acessos de coceira induzidos pela enzima (Figura 4A; 56 ± 12% de inibição). Porém, a naloxona não foi capaz de interferir com a nocicepção espontânea evocada por este agente (Figura 4D).

## **Efeito do tratamento com antiinflamatórios esteroidal e não-esteroidais sobre o comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina**

O efeito de antiinflamatórios esteroidal e não esteroidais sobre as respostas pruriginosas e nociceptivas evocadas pela tripsina foi avaliado pelo pré-tratamento com dexametasona ou, celecoxibe e SC 560, respectivamente. O tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h) preveniu

expressivamente o comportamento pruriginoso induzido tanto pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) (Figura 4B; inibição de  $107 \pm 11\%$ ), quanto pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) (dados não demonstrados; inibição de  $76 \pm 13\%$ ). Contudo, o tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h) não foi capaz de interferir com a nocicepção espontânea induzida pela enzima (300 µg/pata, i.pl.) (Figura 4E). Resultados similares foram obtidos para o inibidor seletivo da COX-2, celecoxibe (10 mg/kg, v.o., 1 h), que preveniu significativamente o comportamento de coçar induzido pela tripsina (Figura 4C;  $65 \pm 12\%$  de inibição), mas não alterou a nocicepção espontânea induzida pela protease (Figura 4F). No entanto, assim como para a nocicepção espontânea (Paszczuk *et al.*, 2008), o inibidor seletivo para a COX-1, SC 560 (5 mg/kg, i.p., 30 min), não foi eficaz sobre a resposta pruriginosa provocada pela tripsina (Figure 4C).

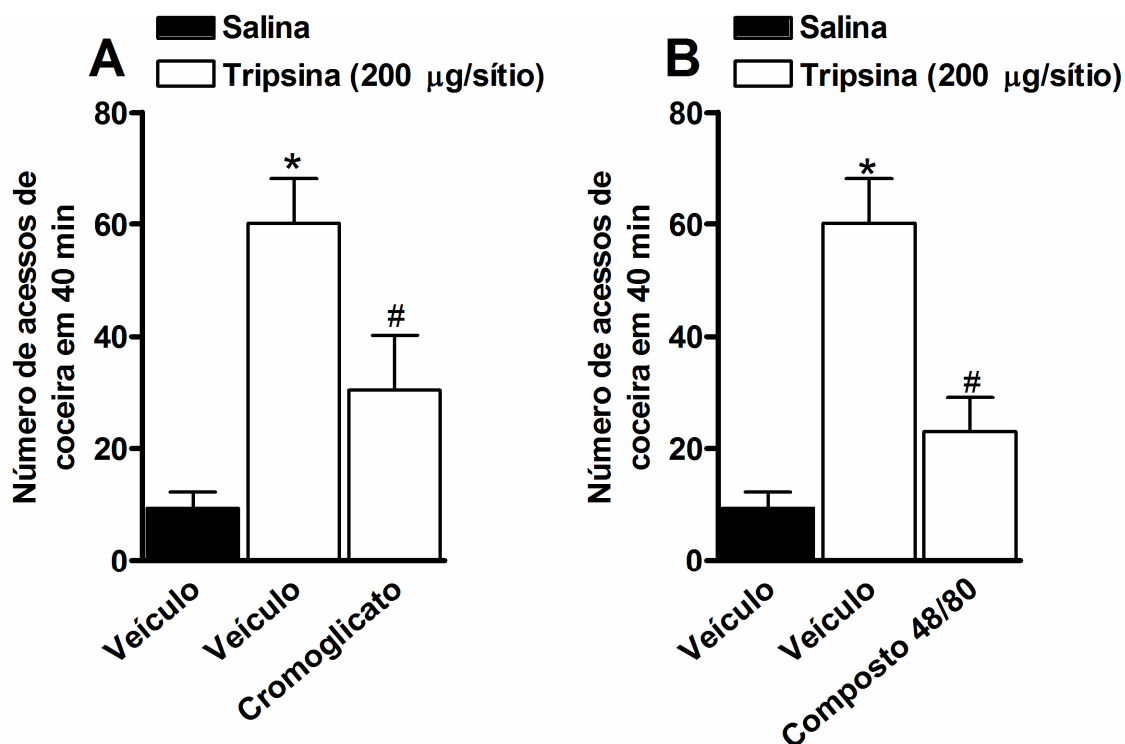


**Figura 4** - Efeito do tratamento com agonista e antagonista opioidérgicos, ou antiinflamatórios esteroidal e não esteroidais sobre o comportamento de coçar e nocicepção espontânea induzidos pela tripsina em camundongos Swiss. **(A)** Efeito do tratamento com morfina (5 ou 10 mg/kg, i.p., 30 min.) ou naloxona (1 mg/kg, i.p., 30 min.) sobre o comportamento de coçar (200 µg/sítio, i.d.) e **(D)** nocicepção espontânea (300 µg/pata, i.pl.) induzidos pela tripsina. **(B)** Efeito do tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 4 h) sobre o comportamento de coçar e **(E)** nocicepção espontânea induzidos pela tripsina. **(C)** Efeito do tratamento com SC 560 (5 mg/kg, i.p., 30 min), inibidor seletivo da COX-1, ou celecoxibe (10 mg/kg, v.o., 1 h), inibidor seletivo da COX-2, sobre o comportamento de coçar ou **(F)** nocicepção espontânea induzidos pela tripsina. Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \* $P < 0.05$ , ou controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), # $P < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnet).

## **Papel dos mastócitos e de mediadores mastocitários no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2**

Para verificar a participação de mastócitos no comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.), camundongos Swiss foram pré-tratados com o estabilizador da membrana de mastócitos, cromoglicato de sódio (8 mg/kg, s.c., uma vez ao dia, durante 6 dias), ou com o agente depletor de mastócitos, composto 48/80 (uma vez ao dia, durante 4 dias, nas doses de 1, 3, 10 e 10 µg/sítio, no 1º, 2º, 3º e 4º dia, respectivamente). O pré-tratamento com cromoglicato de sódio ou com o composto 48/80 preveniu significativamente o número de acessos de coceira induzido pela tripsina (Figura 5A e 5B). As percentagens de inibição foram de  $59 \pm 18 \%$  e  $73 \pm 10 \%$  para o cromoglicato de sódio e composto 48/80, respectivamente.



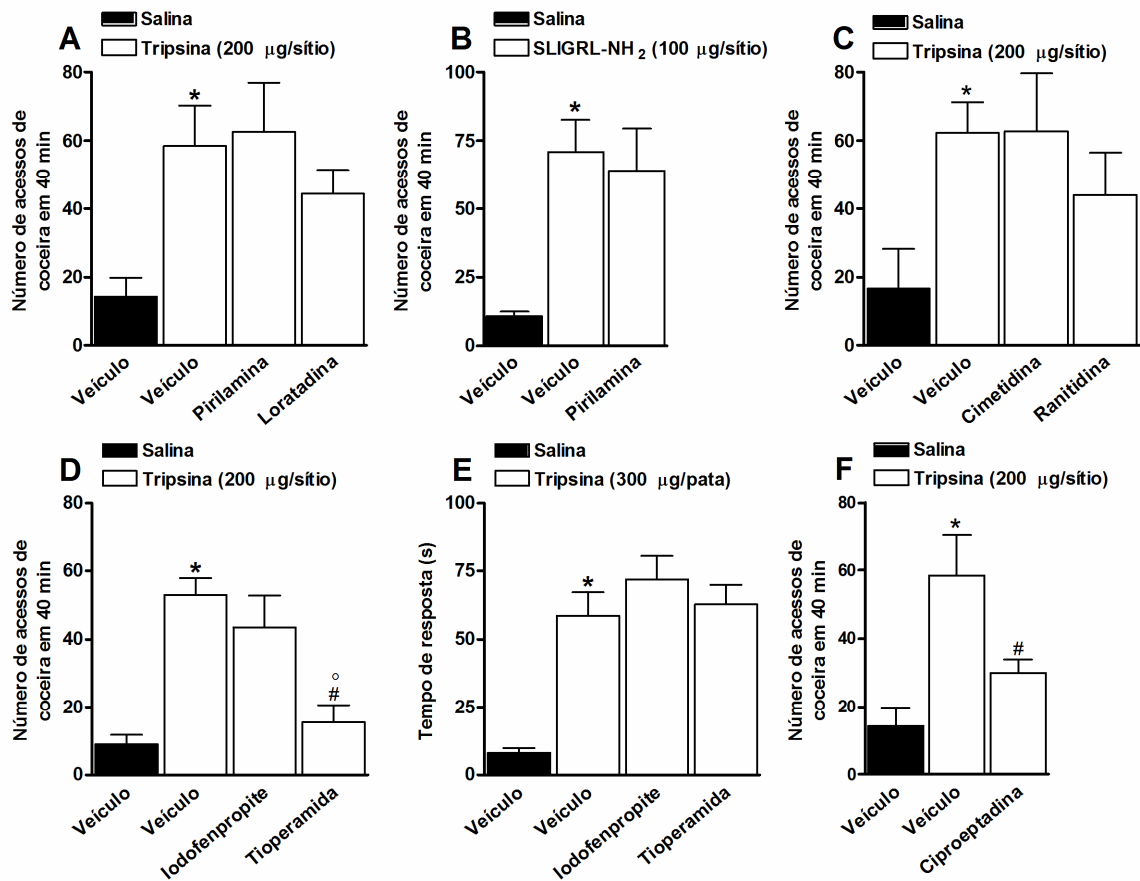


**Figura 5** – Participação de mastócitos no comportamento de coçar induzido pela tripsina em camundongos Swiss. **(A)** Efeito do pré-tratamento com cromoglicato de sódio (8 mg/kg, s.c., uma vez ao dia, durante 6 dias), estabilizador de membrana de mastócitos, sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(B)** Efeito do pré-tratamento com o composto 48/80 (uma vez ao dia, durante 4 dias, nas doses de 1, 3, 10 e 10 µg/sítio, no 1º, 2º, 3º e 4º dia, respectivamente), depletor de mastócitos, sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \* $P < 0.01$ , ou controle (tripsina + veículo), # $P < 0.05$  (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett).

O possível envolvimento da histamina na resposta pruriginosa induzida pelos agonistas do PAR-2 foi avaliado através do uso de antagonistas seletivos para os seus receptores. O pré-tratamento com pirlamina (10 mg/kg, s.c., 30 min), antagonista seletivo para o receptor  $H_1$ , não alterou as respostas induzidas por ambos os agonistas do PAR-2 (Figura 6A e 6B). Confirmando estes resultados, o pré-tratamento com loratadina (10 mg/kg, s.c., 30 min), outro antagonista do receptor  $H_1$ , não inibiu o comportamento de coçar induzido pela tripsina (Figura 6A). Do mesmo modo, o pré-tratamento com ambos os antagonistas do receptor  $H_2$ , ranitidina (10 mg/kg, s.c., 30 min) ou cimetidina (20

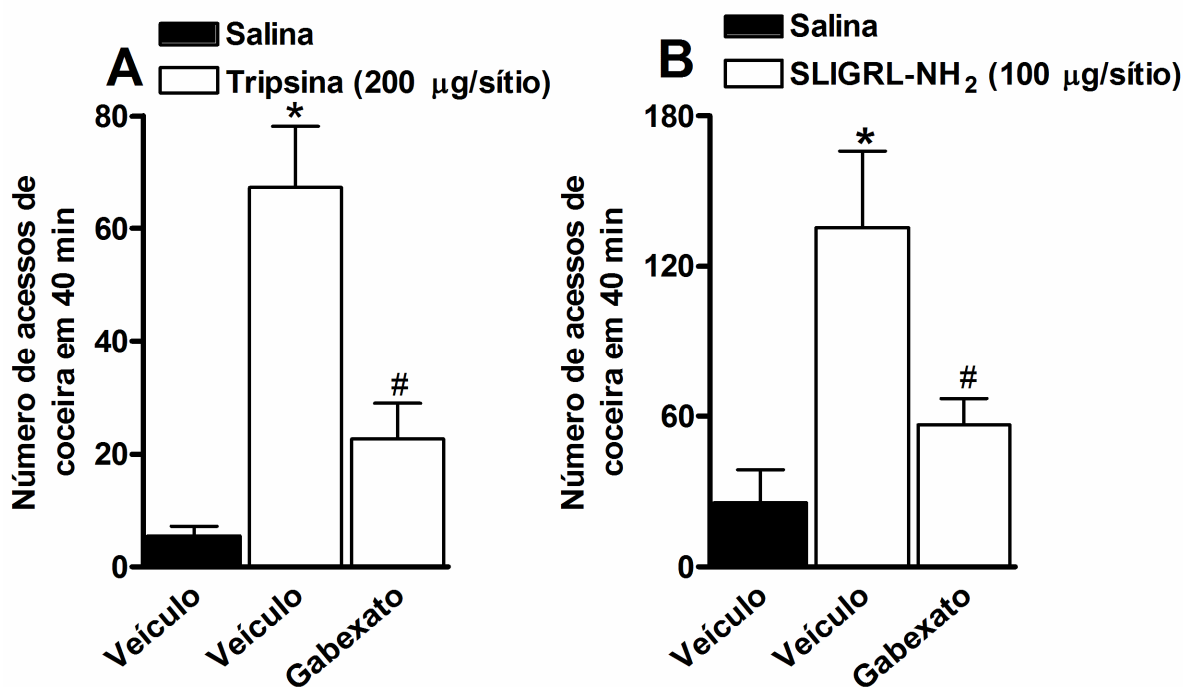
mg/kg, s.c., 30 min), não interferiu de modo significativo com a resposta pruriginosa induzida pela enzima (Figura 6C). Interessantemente, o pré-tratamento com o antagonista não-seletivo dos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, tioperaminda (20 mg/kg, i.p., 30 min), mas não com o antagonista seletivo para o H<sub>3</sub>, iodofenpropite (10 mg/kg, i.p., 30 min), preveniu expressivamente os acessos de coceira induzidos pela tripsina (Figura 6D), com inibição de 85 ± 12%. Além disso, o tratamento com iodofenpropite (10 mg/kg, i.p., 30 min), ou com tioperaminda (20 mg/kg, i.p., 30 min), não foi capaz de interferir com a nocicepção espontânea induzida pela administração i.pl. de tripsina (300 µg/pata, i.pl.) (Figura 6E).

Através do emprego do antagonista misto de receptores histaminérgicos/serotoninérgicos, ciproeptadina, foi investigado o possível envolvimento de receptores serotoninérgicos no comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). A Figura 6F ilustra que o pré-tratamento com ciproeptadina (20 mg/kg, s.c., 30 min) preveniu de forma significativa os acessos de coceira induzidos pela tripsina, com 52 ± 9% de inibição.



**Figura 6** – Participação de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos Swiss. **(A)** Efeito do pré-tratamento com loratadina (10 mg/kg, s.c., 30 min) ou pirilamina (10 mg/kg, s.c., 30 min), antagonistas seletivos para o receptor H<sub>1</sub> histaminérgico, sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(B)** Efeito do pré-tratamento com pirilamina (10 mg/kg, s.c., 30 min.) sobre o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). **(C)** Efeito do pré-tratamento com cimetidina (20 mg/kg, s.c., 30 min) ou ranitidina (10 mg/kg, s.c., 30 min), antagonistas seletivos para o receptor H<sub>2</sub> histaminérgico, sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(D)** Efeito do pré-tratamento com iodofenpropite (10 mg/kg, s.c., 30 min), antagonista seletivo para o receptor H<sub>3</sub> histaminérgico, ou com tioperamida (20 mg/kg, s.c., 30 min), antagonista não-seletivo de receptores H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>, sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(E)** Efeito do pré-tratamento com iodofenpropite (10 mg/kg, s.c., 30 min.) ou tioperamida (20 mg/kg, s.c., 30 min.) sobre a nocicepção espontânea induzida pela tripsina (300 µg/pata, i.pl.). **(F)** Efeito do pré-tratamento com ciproheptadina (20 mg/kg, s.c., 30 min), antagonista misto de receptores histaminérgicos/serotoninérgicos, sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*P<0.05, controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), #P<0.05, ou tratado (tripsina + iodofenpropite), °p<0,05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett ou Bonferroni).

A contribuição da liberação de proteases para as respostas pruriginosas induzidas pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) em camundongos Swiss foi avaliada através do emprego do inibidor não seletivo de proteases, gabexato mesilato. Como demonstrado na Figura 7, tanto a resposta induzida pela tripsina quanto pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> foram prevenidas pelo tratamento com o gabexato mesilato (10 mg/kg, s.c., 30 min) (Figura 7A e 7B), obtendo 72 ± 9% e 53 ± 20% de inibição para a tripsina e SLIGRL-NH<sub>2</sub>, respectivamente.

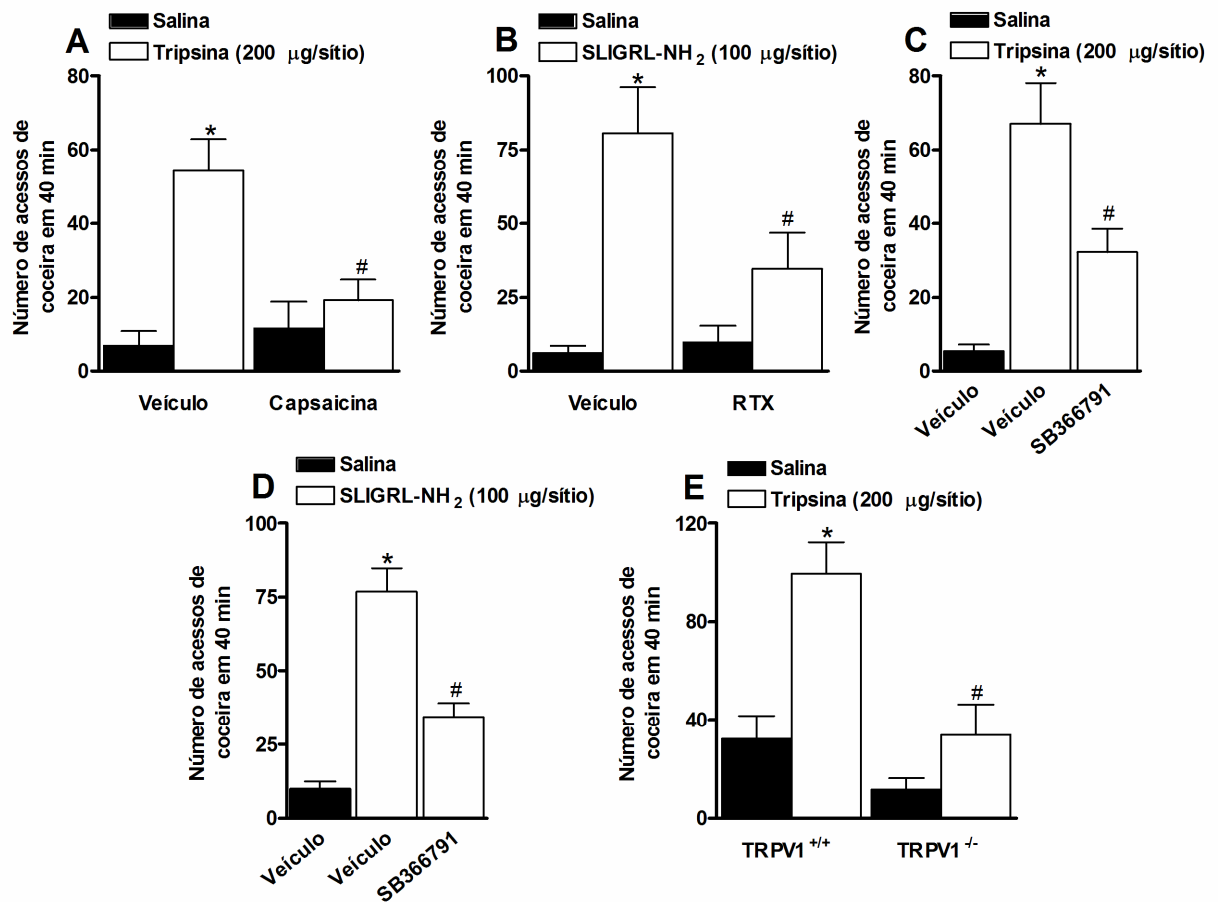


**Figura 7** – Participação de proteases no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos Swiss. **(A)** Efeito do pré-tratamento com o inibidor não-seletivo de proteases, gabexato mesilato (10 mg/kg, s.c., 30 min.), sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou **(B)** pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*P<0.01, ou controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), #P<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett).

## **Papel de fibras sensíveis à capsaicina e do receptor TRPV1 no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos**

Para verificar o papel de fibras sensíveis à capsaicina na resposta induzida pela administração i.d. de agonistas do PAR-2, camundongos Swiss foram submetidos ao protocolo de dessensibilização neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) ou ao tratamento adulto com RTX (30, 70 e 100 µg/kg, s.c., durante 3 dias consecutivos), que causam degeneração irreversível de fibras C. Conforme ilustra a Figura 8A, animais que receberam o tratamento neonatal com capsaicina apresentaram redução significativa no número de acessos de coceira induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.), em comparação aos animais que receberam somente veículo no período neonatal (Figura 8A; inibição de  $74 \pm 11\%$ ). Similarmente, o pré-tratamento com RTX, bloqueou significativamente os acessos de coceira induzidos pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Figura 8B; redução de  $62 \pm 16\%$ ).

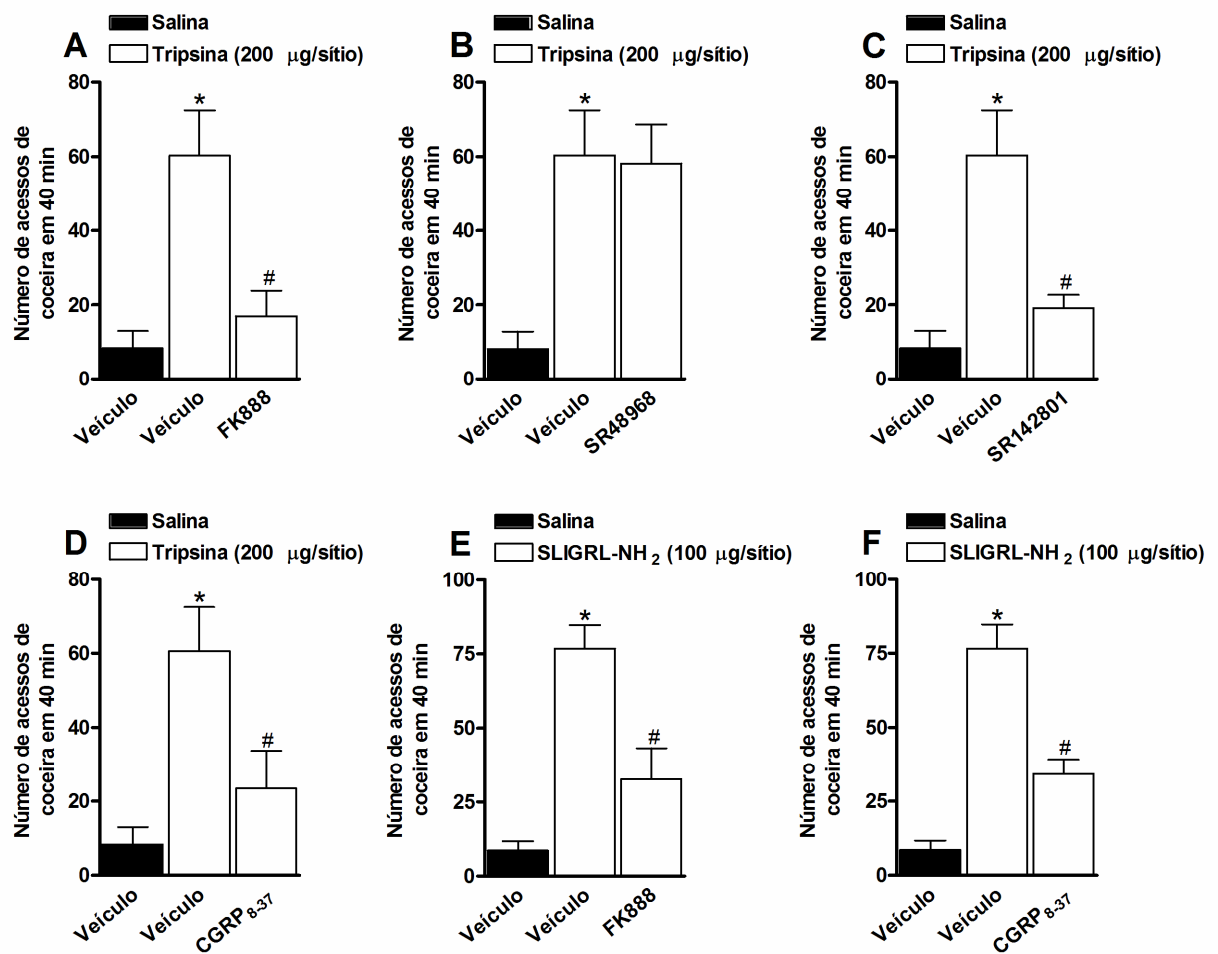
A participação do receptor TRPV1 no comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio) foi avaliada através de abordagens farmacológica, pelo uso do antagonista seletivo para o receptor TRPV1, SB366791 (0,5 mg/kg, s.c., 30 min), e, genética, através do uso de animais com ausência no gene para o TRPV1 (TRPV1<sup>-/-</sup>). Ambas as estratégias, farmacológica e genética, preveniram de forma significativa os acessos de coceira induzido pela administração i.d. de tripsina ( $76 \pm 10\%$  e  $95 \pm 19\%$  de inibição, respectivamente). Além disso, a resposta pruriginosa induzida pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) foi significativamente reduzida quando co-injetado com o SB366791 (1 nmol/sítio, i.d.) (Figura 8D;  $64 \pm 7\%$  de inibição).



**Figura 8** – Papel de fibras sensíveis a capsaicina e do receptor TRPV1 no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos. **(A)** Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(B)** Efeito do tratamento com resiniferatoxina (RTX; 30, 70 e 100 µg/kg, s.c., no 1º, 2º e 3º dia, respectivamente) sobre o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). **(C)** Efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o receptor TRPV1, SB366791 (0,5 mg/kg, s.c., 30 min), sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(D)** Efeito do co-tratamento com o antagonista seletivo para o receptor TRPV1, SB366791 (1 nmol/sítio, i.d.), sobre o comportamento de coçar induzido pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). **(E)** Comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) em animais com ausência no gene para o receptor TRPV1 (TRPV1<sup>-/-</sup>). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*P<0.05, ou controle (tripsina + veículo), #P<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnet).

## **Participação de neuropeptídeos no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos**

O envolvimento do receptor para o CGRP e dos receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>, respectivamente, receptores para SP, NKA e NKB, na resposta pruriginosa induzida pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) foi investigado através do emprego de antagonistas seletivos para estes receptores. O pré-tratamento com os antagonistas para os receptores NK<sub>1</sub> ou NK<sub>3</sub>, respectivamente, FK888 (1 mg/kg, e.v., 15 min) ou SR142801 (3 mg/kg, e.v., 15 min), preveniu significativamente o comportamento de coçar induzido pela tripsina (Figura 9A e 9C; inibições de 84 ± 14% e 79 ± 5%, respectivamente). Do mesmo modo, o pré-tratamento com o antagonista seletivo para o receptor de CGRP, o fragmento CGRP<sub>8-37</sub> (0,3 mg/Kg, i.v., 15 min), bloqueou significativamente o efeito pruriceptivo da tripsina (Figura 9D; inibição de 70 ± 19%). Por outro lado, o pré-tratamento com o antagonista seletivo para o receptor NK<sub>2</sub>, SR48968 (1 mg/Kg, i.v., 15 min), em dose adequada, não foi capaz de interferir com a resposta da enzima (Figura 9B). Além disso, o co-tratamento pela via i.d. com os antagonistas seletivos para o receptor NK<sub>1</sub>, FK888 (1 nmol/sítio, i.d.), ou para o receptor de CGRP, fragmento CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol/sítio, i.d.), preveniu significativamente os acessos de coceira induzidos pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) (Figura 9E e 9F; inibições de 66 ± 16% e 64 ± 7%, respectivamente).



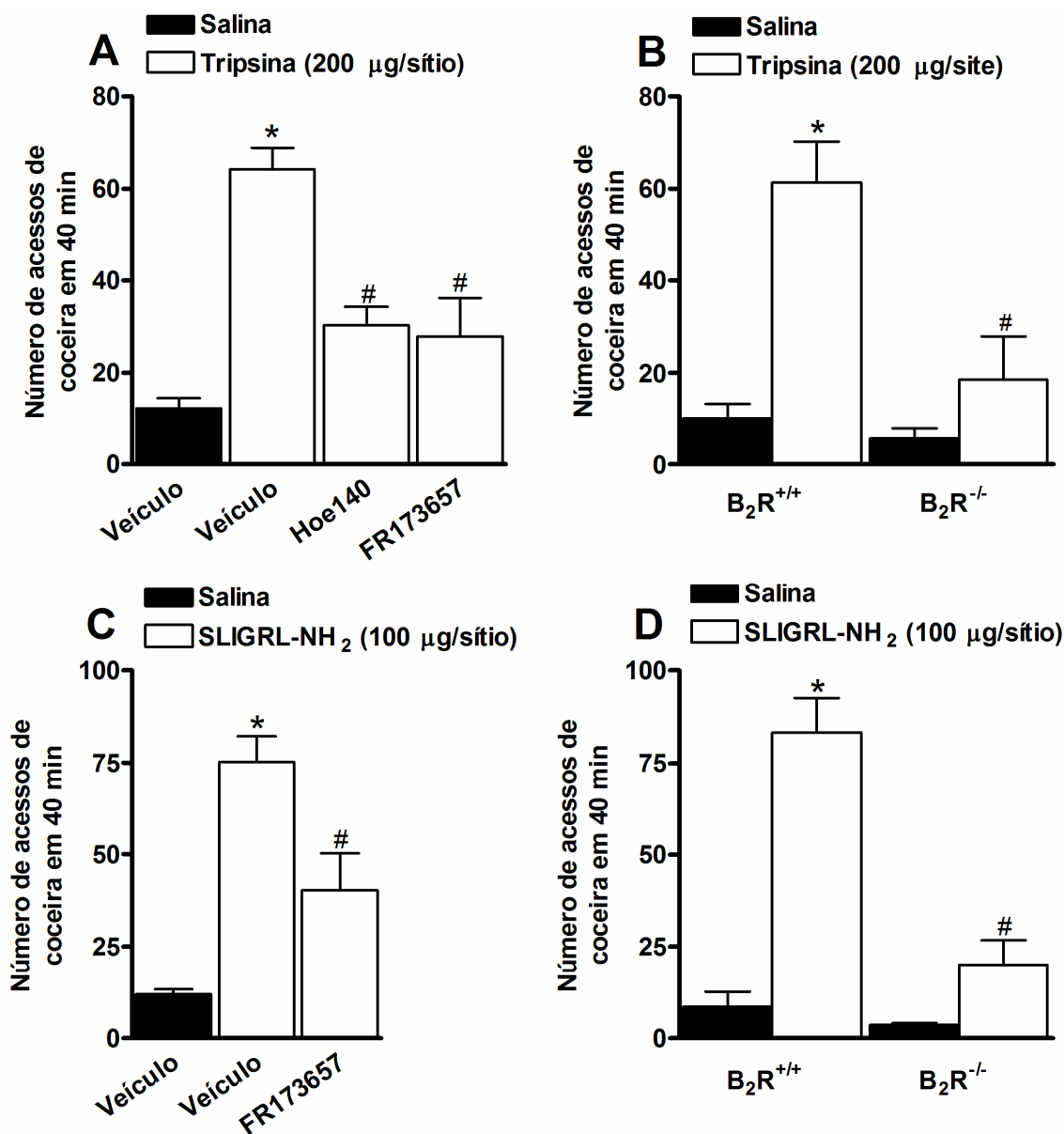
**Figura 9** – Papel de neuropeptídeos no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos Swiss. **(A)** Efeito do tratamento com os antagonistas seletivos para os receptores NK<sub>1</sub>, FK888 (1 mg/kg, e.v., 15 min), **(B)** NK<sub>2</sub>, SR48968 (1 mg/Kg, e.v., 15 min), **(C)** NK<sub>3</sub>, SR142801 (3 mg/kg, e.v., 15 min), e **(D)** para o receptor do CGRP, fragmento CGRP<sub>8-37</sub> (0,3 mg/kg, i.v., 15 min), sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(E)** Efeito do co-tratamento com os antagonistas seletivos para o receptor NK<sub>1</sub>, FK888 (1 nmol/sítio, i.d.), ou para o receptor do CGRP, fragmento CGRP<sub>8-37</sub> (1 nmol/sítio, i.d.), sobre o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*P<0.01, ou controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), #P<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett).



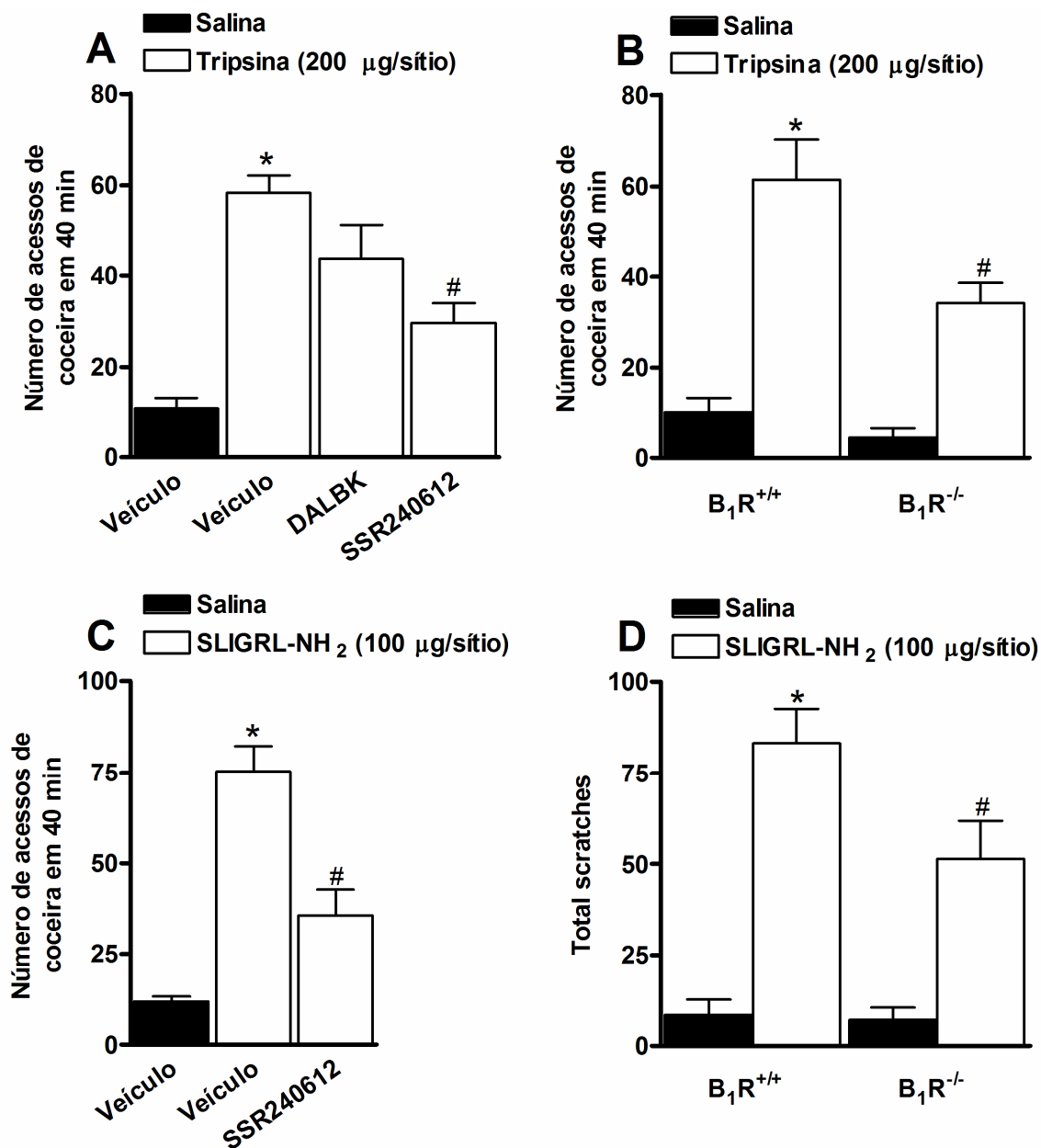
## **Envolvimento dos receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> para as cininas no comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos**

Nesta série de experimentos foram avaliados os possíveis efeitos do bloqueio dos B<sub>2</sub>R ou B<sub>1</sub>R para cininas na prevenção do comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos. Para tal, camundongos *Swiss* foram previamente tratados com os antagonistas seletivos do B<sub>2</sub>R, Hoe 140 (50 nmol/Kg, s.c.) e FR173657 (30 mg/Kg, i.p.), ou com os antagonistas seletivos do B<sub>1</sub>R, DALBK (150 nmol/Kg, s.c.) e SSR240612 (1 mg/Kg, i.p.), e após 30 min foram injetados por via i.d. com tripsina (200 µg/sítio) ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio). Os animais pré-tratados com Hoe 140 ou com FR173657 apresentaram redução expressiva do número de acessos de coceira induzidos pela tripsina no sítio injetado (Figura 10A; 65 ± 7% e 70 ± 16% de inibição, respectivamente). Do mesmo modo, o tratamento com FR173657 preveniu a resposta pruriginosa induzida pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Figura 10C; 56 ± 16% de inibição). Por outro lado, a administração prévia de DALBK não alterou de maneira significativa o comportamento de coçar induzido pela tripsina (Figura 11A). No entanto, o tratamento com o SSR240612 foi eficaz sobre o comportamento de coçar induzido por ambos os agentes pruriginosos, tripsina (Figura 11A; 60 ± 9% de inibição) e SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Figura 11C; 62 ± 11% de inibição). Posteriormente, estes dados foram confirmados através de experimentos realizados em animais com deleção do gene para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) ou B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>). Como ilustrado nas Figuras 10B e 10D, os animais nocaute para o B<sub>2</sub>R apresentaram redução expressiva no número de acessos de coceira induzido pela injeção local de tripsina (200 µg/sítio, i.d.) (Figura 10B; 83 ± 18% de inibição) ou do peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) (Figura 10D; 84 ± 9% de inibição)

em comparação aos animais da linhagem selvagem (C57BL/6, B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>). De modo similar, porém em menor magnitude, a ausência no gene para o B<sub>1</sub>R também preveniu de forma significativa os acessos de coceira induzidos pela administração de tripsina (Figura 11B; 53 ± 9% de inibição) ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Figura 11D; 42 ± 14% de inibição).

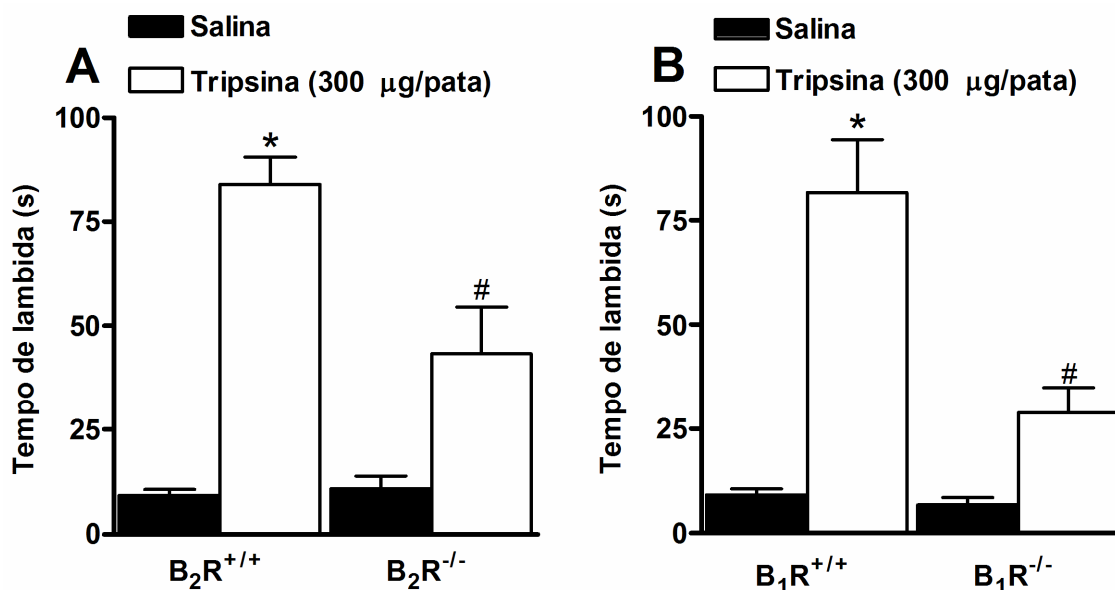


**Figura 10** – Efeito do bloqueio do B<sub>2</sub>R para cininas sobre comportamento de coçar induzido por agonistas do receptor PAR-2 em camundongos. **(A)** Efeito do pré-tratamento com antagonistas seletivos para o B<sub>2</sub>R, Hoe 140 (50 nmol/Kg, s.c., 30 min.) e FR173657 (30 mg/Kg, i.p., 30 min.) sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(C)** Efeito do pré-tratamento com o antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R, FR173657 (30 mg/Kg, i.p., 30 min.), sobre o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). **(B)** Comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou **(D)** pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) em animais selvagem (B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>) ou com deleção gênica para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*P<0.05, ou controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), #P<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnet).



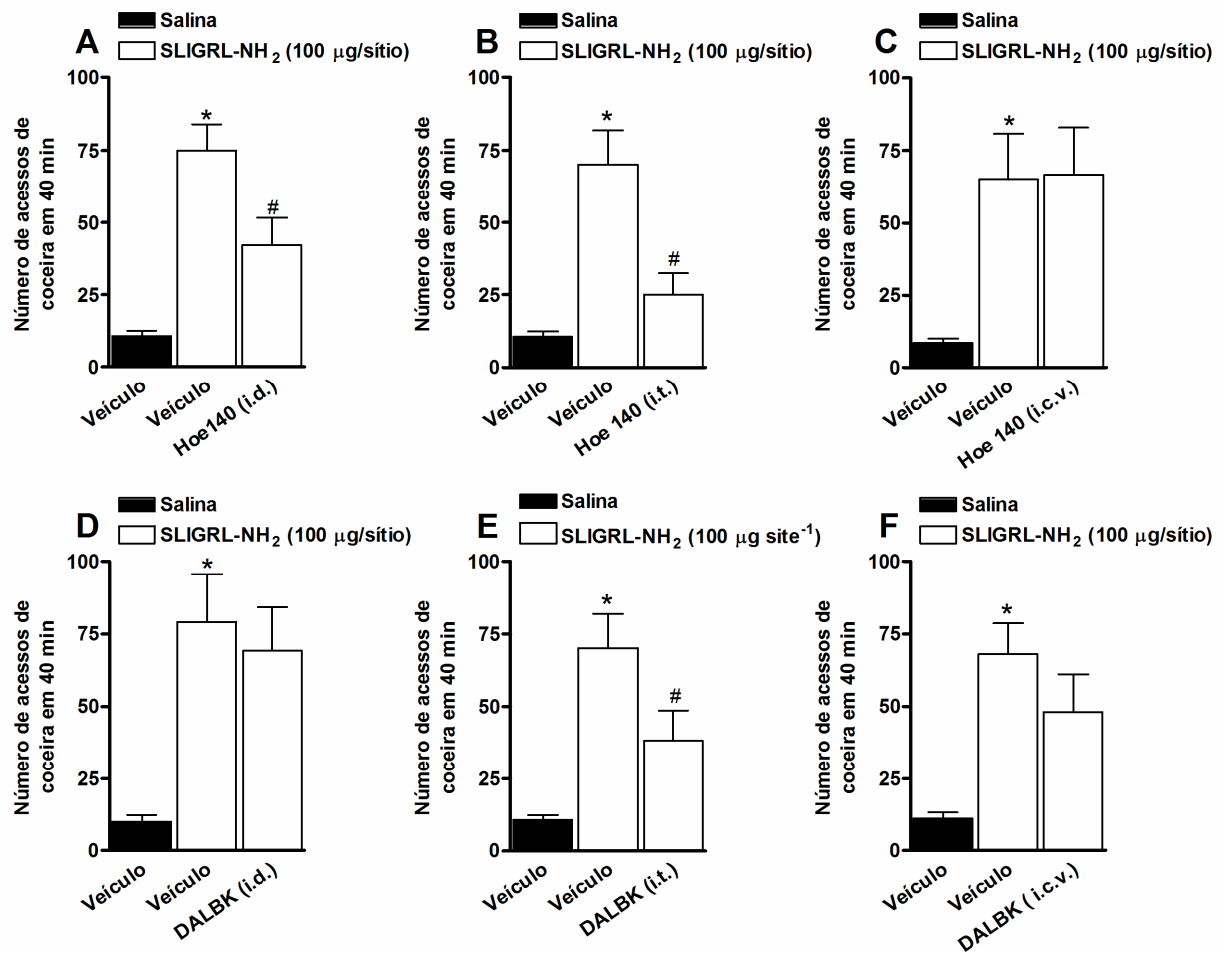
**Figura 11** – Efeito do bloqueio do B<sub>1</sub>R para cininas sobre comportamento de coçar induzido por ativadores do receptor PAR-2 em camundongos. **(A)** Efeito do pré-tratamento com antagonistas seletivos para o B<sub>1</sub>R, DALBK (150 nmol/Kg, s.c., 30 min.) e SSR240612 (1 mg/Kg, i.p., 30 min.) sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.). **(C)** Efeito do pré-tratamento com o antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R, SSR240612 (1 mg/Kg, i.p., 30 min.), sobre o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). **(B)** Comportamento de coçar induzido pela tripsina (200 µg/sítio, i.d.) ou **(D)** pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) em animais selvagem (B<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>) ou com deleção gênica para B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*P<0.05, ou controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), #P<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnet).

Posteriormente, ainda através do emprego de animais nocaute para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) ou B<sub>1</sub> (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>), foi analisado o possível envolvimento dos receptores cininérgicos na nocicepção espontânea causada pela tripsina (300 µg/sítio, i.pl.). De acordo com os dados da Figura 12, é possível observar que o comportamento nociceptivo desencadeado pela tripsina envolve a ativação de ambos os receptores cininérgicos, B<sub>2</sub> (Figura 14A) e B<sub>1</sub> (Figura 14B), uma vez que a deleção destes receptores causou redução expressiva do comportamento nociceptivo induzido pela administração i.pl. da enzima (redução de 55 ± 15% e 73 ± 8% para B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> e B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, respectivamente).



**Figura 12** – Envolvimento dos receptores cininérgicos na nocicepção espontânea induzida pela ativação do receptor PAR-2 em camundongos. **(A)** Nocicepção espontânea induzida pela tripsina (300 µg/pata, i.pl.) em animais com deleção gênica para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) ou **(B)** B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) para as cininas. Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina, \*P<0.05, ou tripsina, #P<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnet).

Ademais, com o objetivo de verificar a participação de receptores cininérgicos localizados em diferentes sítios na resposta pruriceptiva induzida pelo peptídeo agonista do PAR-2, camundongos Swiss foram tratados com os antagonistas seletivos para estes receptores por diferentes vias de administração. Os resultados apresentados na Figura 13 demonstram que o tratamento local (3 nmol/sítio, i.d.) (Figura 13A) ou i.t. (100 pmol/sítio, i.t., 15 min) (Figura 13B) com o Hoe 140 (antagonista para o B<sub>2</sub>R) foi capaz de reduzir a resposta pruriceptiva evocada pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.), com inibições de 51 ± 15% e 76 ± 13%, respectivamente. No entanto, o tratamento por via i.c.v. (100 pmol/sítio, 15 min) não afetou a resposta pruriginosa evocada pela injeção i.d. do peptídeo (Figura 13C). A administração por via i.t. do antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R, DALBK (25 pmol/sítio, 15 min), inibiu significativamente o comportamento pruriginoso induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Figura 13E; 54 ± 17% de inibição). Por outro lado, o tratamento local (0,3 nmol/sítio, i.d.) ou i.c.v. (25 pmol/sítio, 15 min) não foi capaz de interferir de maneira significativa com o comportamento de coçar induzido pela ativação do PAR-2 (Figura 13D e 13F).

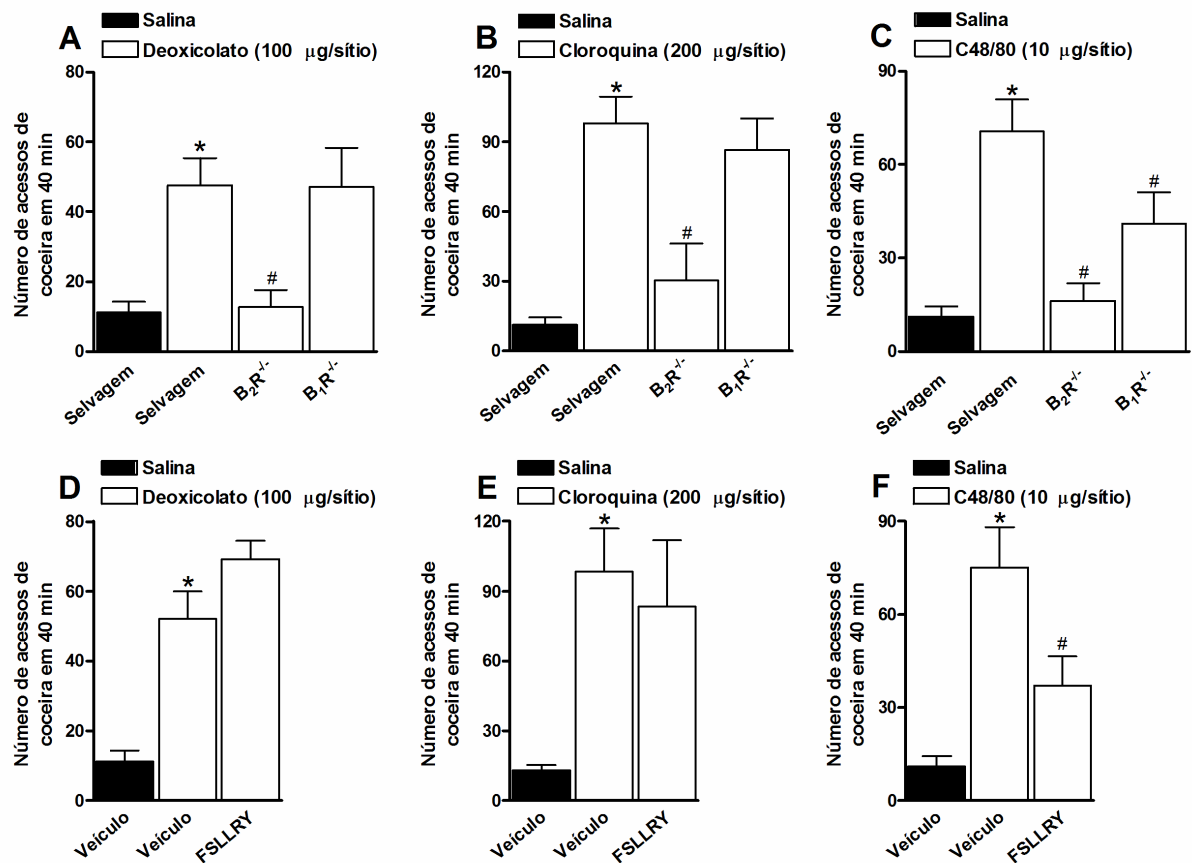


**Figura 13** – Efeito do tratamento com antagonistas dos receptores cininérgicos administrados por diferentes vias sobre o comportamento de coçar induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). **(A)** Efeito do tratamento i.d. (3 nmol/sítio, i.d.), **(B)** i.t. (25 pmol/sítio, i.t., 15 min) ou **(C)** i.c.v. (25 pmol/sítio, i.c.v., 15 min) com Hoe 140 (antagonista para o B<sub>2</sub>R). **(D)** Efeito do tratamento i.d. (0,3 nmol/sítio, i.d.), **(E)** i.t. (100 pmol/sítio, i.t., 15 min) ou **(F)** i.c.v. (100 pmol/sítio, i.c.v., 15 min) com DALBK (antagonista para o B<sub>1</sub>R). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*p<0.05, ou controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), #p<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnett).

## **Envolvimento dos receptores cininérgicos e do receptor PAR-2 no comportamento de coçar induzido por diferentes agentes pruriginosos em camundongos**

Em uma segunda abordagem, a fim de investigar o envolvimento dos receptores cininérgicos na resposta pruriginosa desencadeada por outros estímulos pruriginosos, animais com deficiência dos genes para o B<sub>2</sub>R ou B<sub>1</sub>R foram injetados por via i.d. na região dorsal do pescoço com três diferentes agentes pruriginosos: deoxicolato de sódio (100 µg/sítio, i.d.), cloroquina (200 µg/sítio, i.d.) ou composto 48/80 (10 µg/sítio, i.d.). Os dados expressos na Figura 14 demonstram que a deleção gênica do B<sub>2</sub>R interferiu com o comportamento de coçar desencadeado pelos três agentes testados, deoxicolato de sódio (Figura 14A; 96 ± 13% de inibição), cloroquina (Figura 14B; 78 ± 8% de inibição), ou composto 48/80 (Figura 14C; 92 ± 9% de inibição). Por outro lado, animais nocaute para o B<sub>1</sub>R apresentaram redução apenas na resposta induzida pelo composto 48/80 (Figura 14C; 50 ± 17% de inibição). Em seguida, foi avaliada a sensibilidade dos três modelos ao tratamento com o antagonista seletivo para o receptor PAR-2, FSLLRY-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.). Curiosamente, somente a coceira induzida pelo composto 48/80 (10 µg/sítio, i.d.) foi prevenida pelo co-tratamento com o FSLLRY-NH<sub>2</sub> (Figura 14 F; 59 ± 15% de inibição).





**Figura 14** – Envolvimento dos receptores cininérgicos e do receptor PAR-2 no comportamento de coçar induzido por diferentes agentes pruriginosos em camundongos C57BL/6. **(A)** Comportamento de coçar induzido pelo deoxicolato de sódio (100 µg/sítio, i.d.), **(B)** cloroquina (200 µg/sítio, i.d.) ou **(C)** composto 48/80 (10 µg/sítio, i.d.) em animais selvagem (B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> e B<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup>) ou com deleção gênica do B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) ou B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) para as cininas. **(D)** Efeito do co-tratamento com o antagonista seletivo para o receptor PAR-2, FSLRY-NH<sub>2</sub> (100 µg/sítio, i.d.) sobre o comportamento de coçar induzido pelo deoxicolato de sódio (100 µg/sítio, i.d.), **(E)** cloroquina (200 µg/sítio, i.d.) ou **(F)** composto 48/80 (10 µg/sítio, i.d.). Cada coluna representa a média de 6–10 animais e as barras verticais demonstram os E.P.M. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo salina (salina + veículo), \*P<0.05, ou controle (tripsina + veículo ou SLIGRL-NH<sub>2</sub> + veículo), #P<0.05 (ANOVA de uma via, seguida do Teste de Dunnet).

## **DISCUSSÃO**

Estudos recentes indicam a participação do receptor PAR-2 na transmissão da sensação pruriginosa (Thomsen *et al.*, 2002; Steinhoff *et al.*, 2003; Paus *et al.*, 2006; Shimada *et al.*, 2006; Ui *et al.*, 2006). De fato, a administração de agonistas do PAR-2 na pele é capaz de causar sensação de coceira, tanto em humanos saudáveis, quanto em pacientes com dermatite atópica (Thomsen *et al.*, 2002; Steinhoff *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que a administração i.d. de agonistas do PAR-2 é capaz de elicitar comportamento de coçar em animais de experimentação (Shimada *et al.*, 2006; Ui *et al.*, 2006, Sun e Chen, 2007; Nakano *et al.*, 2008; Tsujii *et al.*, 2008). De maneira interessante, confirmando e estendendo os dados da literatura, o presente estudo demonstrou que a injeção i.d. de ativadores do PAR-2, na região dorsal do pescoço de camundongos, causa comportamento de coçar, sugestivo de um efeito pruriginoso. Estes dados mostram que a injeção de tripsina ou do fragmento peptídico SLIGRL-NH<sub>2</sub>, mas não de tripsina inativada pelo calor ou do fragmento inverso LRGILS-NH<sub>2</sub>, foi capaz causar aumento dependente da dose no número de acessos de coceira ao sítio injetado. Ademais, é importante salientar que este efeito foi observado em duas linhagens diferentes de camundongos, *Swiss* e *C57BL/6*. Além disso, confirmando dados prévios da literatura (Kuraishi *et al.*, 1995; Inagaki *et al.*, 2002), a administração i.d. do degranulador de mastócitos, composto 48/80, causou comportamento de coçar em camundongos, um efeito que parece ser dependente da liberação de histamina (Sugimoto *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2006; Trentin, 2006) e de outros

agentes pruriginosos derivados de mastócitos, como a 5-HT (Inagaki *et al.*, 2002). Curiosamente, o perfil temporal de resposta obtido para o comportamento de coçar induzido pelo composto 48/80 foi semelhante ao observado para os agonistas do PAR-2. Em conjunto, estes dados nos permitem sugerir que a injeção i.d. de agonistas do receptor PAR-2 pode ser usada como um modelo experimental reproduzível para o estudo de mecanismos relacionados à transmissão da sensação de coceira em animais de experimentação, mas principalmente como um modelo de triagem (*screening*) de possíveis abordagens terapêuticas destinadas ao tratamento de condições pruriginosas.

A tripsina é uma serino-protease que pode clivar e ativar os receptores PAR-1, PAR-2 e PAR-4; no entanto, apresenta maior seletividade para o receptor PAR-2 (Nystedt *et al.*, 1994; Molino *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998; Cotrell *et al.*, 2004; Barry *et al.*, 2006). Neste estudo, foi demonstrado que o efeito pruriginoso da tripsina é dependente da preservação da atividade serino-proteolítica, uma vez que animais injetados com tripsina inativada pelo calor ou que foram co-tratados com os inibidores enzimáticos, aprotinina ou inibidor de tripsina, apresentaram menor número de acessos de coceira em comparação ao grupo controle. Apesar da capacidade da tripsina em ativar receptores PAR-1 e PAR-4, nossos resultados sugerem fortemente que a coceira induzida por esta protease é mediada principalmente pela clivagem e posterior ativação do receptor PAR-2, já que o co-tratamento com o antagonista seletivo para o PAR-2, fragmento FSLRY-NH<sub>2</sub>, ou a dessensibilização do receptor PAR-2, pela administração repetida de tripsina na pele, bloquearam expressivamente a resposta pruriceptiva da enzima. É importante mencionar que estudos *in vitro* demonstraram que a atividade proteolítica da tripsina não é alterada na

presença do peptídeo antagonista FSLLRY-NH<sub>2</sub> (Al-Ani *et al.*, 2002). Como esperado, o co-tratamento com o FSLLRY-NH<sub>2</sub>, ou a dessensibilização prévia do PAR-2, interferiram com a resposta comportamental evocada pelo peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub>. Estudos recentes têm demonstrado que a injeção i.d. de triptase, ou do agonista seletivo para o PAR-2, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, é capaz de induzir comportamento pruriginoso em camundongos (Shimada *et al.*, 2006; Ui *et al.*, 2006; Sun e Chen, 2007; Nakano *et al.*, 2008; Tsujii *et al.*, 2008). Além disso, Ui e colaboradores (2006) demonstraram que a ação pruriginosa da triptase é bloqueada de maneira dependente da dose pelo co-tratamento com o FSLLRY-NH<sub>2</sub>. Embora os resultados do presente trabalho sugiram fortemente que os efeitos da tripsina sobre o comportamento de coçar são essencialmente dependentes da clivagem serino-proteolítica do PAR-2 e ativação subsequente do receptor, as ações desta enzima em outros sítios não podem ser totalmente excluídas. Recentemente, Tsujii e colaboradores (2008) demonstraram que a aplicação i.d. de agonistas para os receptores PAR-1 ou PAR-4, mas não para o PAR-3, é capaz de gerar comportamento de coçar em camundongos. Nesse sentido, estudos adicionais empregando antagonistas seletivos para os receptores PAR-1 e PAR-4 sobre as ações pruriginosas da tripsina, poderiam confirmar o sítio preferencial de ação da enzima neste modelo.

Embora os efeitos da administração de agonistas do PAR-2 no dorso de camundongos levem ao surgimento de um comportamento sugestivo de prurido, uma publicação recente do nosso grupo demonstrou que a administração de tripsina na pata de camundongos é capaz de gerar comportamento aceito como nociceptivo, caracterizado predominantemente pelo comportamento de lamber a pata (*licking*) (Paszczuk *et al.*, 2008). Este

efeito é predominantemente mediado pela ativação do receptor PAR-2, uma vez que a deleção do gene para este receptor (PAR-2<sup>-/-</sup>) praticamente abole o comportamento nociceptivo (Paszczuk *et al.*, 2008). Ademias, foi previamente demonstrado que o peptídeo agonista do PAR-2, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, causa comportamento nociceptivo quando injetado na pata de ratos (Kawabata *et al.*, 2001a; 2002). Sendo assim, a fim de verificar as possíveis diferenças entre os modelos de nocicepção e coceira induzidos pela tripsina em camundongos, foram avaliados os efeitos do tratamento com drogas utilizadas no estudo da dor e/ou prurido sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina, comparando estes resultados com os efeitos obtidos sobre a nocicepção espontânea induzida pela enzima. Os efeitos do agonista (morfina) e antagonista (naloxona) opióides, ou de antiinflamatórios esteroidal (dexametasona) e não-esteroidais (celecoxibe e SC 560), foram avaliados sobre ambas as respostas induzidas pela tripsina.

Alguns estudos recentes sugerem que as vias neuronais que conduzem a sensação pruriginosa são tonicamente inibidas pela atividade de neurônios nociceptivos (para revisão, ver Schmelz, 2005). De fato, têm sido verificado que o estado de analgesia segmental, causado pela administração de agonistas do receptor  $\mu$  opióide na medula espinhal, é acompanhado de prurido (Andrew *et al.*, 2003, citado por Schmelz, 2005). Curiosamente, os resultados do presente trabalho demonstram que o pré-tratamento com morfina, agonista preferencial de receptores opióides do tipo  $\mu$ , que induz analgesia por mecanismos centrais e periféricos, bloqueou tanto o comportamento pruriginoso, quanto o nociceptivo desencadeado pela tripsina. No entanto, a dose necessária de morfina para interferir significativamente com a nocicepção induzida pela

tripsina é maior do que aquela capaz de inibir o comportamento pruriginoso. Corroborando com estes resultados, Kawabata e colaboradores (2002) demonstraram que a nocicepção espontânea induzida pelo agonista do PAR-2, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, em ratos é inibida pelo tratamento com o agonista seletivo do receptor  $\mu$  opióide, DAMGO. Estes resultados preliminares sugerem que os acessos de coceira causados pela tripsina apresentam um componente nociceptivo. Contudo, tem sido demonstrado que agonistas do receptor opióide do tipo  $\kappa$  apresentam efeito anti-pruriginoso em macacos Rhesus e roedores (Yamaguchi *et al.*, 1999; Ko *et al.*, 2003; Wakasa *et al.*, 2004; Inagaki *et al.*, 2006); além disso, também aliviam o prurido em pacientes com coceira crônica (Wikström *et al.*, 2005; Dawn e Yosipovitch, 2006). Além disso, foi reportado que antagonistas  $\kappa$  opióides causam prurido em animais de experimentação (Kamei e Nagase, 2001). Desse modo, pode-se especular que o efeito anti-pruriginoso observado para a morfina seja mediado pela ativação de receptores  $\kappa$  opióides localizados em estruturas centrais. Curiosamente, os resultados do presente estudo demonstram também que o tratamento com naloxona, antagonista não seletivo para os receptores opioidérgicos, preveniu significativamente os efeitos comportamentais da tripsina quando administrada no dorso, mas não interferiu com a resposta da enzima quando aplicada na pata. Estes achados são suportados por dados prévios da literatura, demonstrando que antagonistas do receptor  $\mu$  opióide apresentam eficácia contra o prurido induzido experimentalmente (Heyer *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 2004) e também em pacientes com coceira associada a colestase (Jones, 2002). Sendo assim, estes resultados confirmam e fornecem maior base aos dados da literatura acerca do envolvimento dos receptores opioidérgicos no prurido

experimental, permitindo sugerir que o comportamento gerado pela administração de tripsina no dorso de camundongos envolve preferencialmente componentes pruriceptivos, ao invés de causar nocicepção.

Embora os efeitos adversos do uso prolongado de corticóides sejam bem conhecidos, a importância e eficácia do uso tópico desta classe de antiinflamatórios no tratamento ou alívio dos sintomas de condições inflamatórias e/ou pruriginosas da pele é bem aceita. No entanto, estudos em animais de experimentação utilizando diferentes modelos de coceira têm sugerido um papel pouco relevante para a dexametasona na redução desta resposta comportamental (Takano *et al.*, 2003; Trentin, 2006; Inagaki *et al.*, 2006). O tratamento com dexametasona não influenciou a coceira aguda induzida pela histamina, composto 48/80 ou endotelina em camundongos (Takano *et al.*, 2003; Trentin, 2006). Ainda, apesar do seu potente efeito antiinflamatório, este corticóide parece ser pouco efetivo sobre o prurido envolvido nos modelos de dermatite atópica induzida por ovalbumina ou hapteno em camundongos previamente sensibilizados, ou ainda pela dieta modificada em camundongos nude HR-1 (*HR-1 hairless mice*) (Takano *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2007). Ao contrário dos dados da literatura, os resultados do presente trabalho demonstram que o pré-tratamento com dexametasona, previne significativamente os acessos de coceira induzidos pela tripsina, sem interferir com a nocicepção induzida por este agente. Corroborando estes resultados, tem sido demonstrado que o tratamento com dexametasona apresenta eficácia anti-pruriginosa em estudos com camundongos NC/Nga, uma linhagem de camundongos que sob condições convencionais, mas não na condição SPF (*specific-pathogen-free*), desenvolvem espontaneamente

sinais de dermatite atópica, semelhantes aos sintomas observados em pacientes atópicos, como por exemplo, prurido e lesões na pele (Takano *et al.*, 2003). Sendo assim, pode-se sugerir que o efeito anti-pruriginoso da dexametasona observado neste estudo seja decorrente da sua ação antiinflamatória, possivelmente por inibir a síntese de proteínas com ação pruriginosa em células residentes da pele. De fato, células neuronais, queratinócitos, mastócitos, células endoteliais, células de Langerhans, células Merkel e fibroblastos são células presentes na pele que expressam e liberam uma grande variedade de mediadores e proteínas, com potencial nociceptivo ou pruriginoso. Dentre estas moléculas destacam-se: citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), neuropeptídeos (SP, NKA e CGRP), neurotrofinas (NGF, BDNF e neurotrofina 4), ciclooxigenase (COX)-2 e seus produtos (PGE $_2$ ), hormônio liberador de corticotropina (CRH), polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP), pró-opiomelanocortina (POMC), polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), endotelinas e proteases (para revisão, ver Paus *et al.*, 2006; Steinhoff *et al.*, 2006).

As enzimas COX-1 e COX-2 são responsáveis pela produção de prostanóides a partir do ácido araquidônico. No entanto, estas enzimas apresentam diferenças no perfil de expressão na maioria dos tecidos do organismo. Enquanto a COX-1 é geralmente encontrada expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos, a enzima COX-2 pode ter sua expressão induzida em uma grande variedade de células pela ação de diferentes estímulos inflamatórios (para revisão, ver Dubois *et al.*, 1998). Alguns estudos têm demonstrado que a estimulação de receptores PAR em tecidos periféricos causa a ativação de enzimas COXs (Macfarlane *et al.*, 2001; Koetzer *et al.*, 2004). Koetzer e colaboradores (2004) demonstraram que a injeção i.t. de



agonistas dos receptores PAR-1 e PAR-2 causa liberação de PGE<sub>2</sub> na medula espinhal de ratos, contribuindo para a hiperalgesia térmica. Porém, os resultados do presente trabalho demonstraram que a nocicepção espontânea induzida pela tripsina parece não depender da ativação da enzima COX-2. Estes resultados confirmam dados prévios da literatura demonstrando que o tratamento com indometacina (inibidor COX1/COX-2), celecoxibe (inibidor seletivo da COX-2) ou SC 560 (inibidor seletivo da COX-1) não foi capaz de inibir a nocicepção espontânea induzida pela tripsina injetada por via i.pl. (Paszczuk, 2007; Paszczuk *et al.*, 2008). Contrariamente aos resultados obtidos na nocicepção, o comportamento pruriginoso induzido pela tripsina, no presente trabalho, foi prevenido pelo pré-tratamento com celecoxibe, mas não com o inibidor seletivo da COX-1 (SC 560). Em conformidade com estes resultados, foi demonstrado recentemente que a trombina e tripsina induzem aumento da expressão do RNAm e da proteína para a enzima COX-2, sem interferir com a expressão da COX-1, em células endoteliais e pulmonares humanas (Chambers *et al.*, 2003; Syeda *et al.*, 2006).

Previamente, foi relatado que a PGE<sub>2</sub> é capaz de causar sensação de coceira quando aplicada por iontoforese na pele de pacientes com dermatite atópica, ou até mesmo em voluntários saudáveis (Neisius *et al.*, 2002). Além disso, através de estudos de microneurografia, foi verificado que a aplicação de PGE<sub>2</sub> na pele de voluntários sadios pode ativar fibras sensíveis a histamina e insensíveis a estímulos mecânicos, causando sensação de coceira (Schmelz *et al.*, 2003). Ademais, tem sido descrito que a PGE<sub>2</sub> pode induzir liberação de neurotrofinas a partir queratinócitos, um evento que é importante para a transmissão da sensação de coceira para o sistema nervoso (Kanda *et al.*, 2005;

Steinhoff *et al.*, 2006). No entanto, a injeção i.d. deste prostanóide em camundongos não é capaz de causar comportamento pruriginoso, e o pré-tratamento com o inibidor não seletivo de COX, indometacina, não foi efetivo sobre a coceira induzida pelo composto 48/80 ou histamina em camundongos (Inagaki *et al.*, 2002; Arai *et al.*, 2004). Todavia, a aplicação tópica de PGE<sub>2</sub> ou de PGD<sub>2</sub> nos olhos de cobaias promove reflexo de coçar, uma resposta também evocada pela administração de histamina, mas não de ácido acético, neste mesmo modelo (Woodward *et al.*, 1995). Estudos em camundongos NC/Nga com dermatite espontânea ou induzida por hapteno, verificaram aumento expressivo nos níveis cutâneos de alguns prostanóides (PGE<sub>2</sub>, 6-queto-PGF<sub>1α</sub> e PGF<sub>2α</sub>); no entanto, foi observada diminuição na concentração PGD<sub>2</sub> (Sugimoto *et al.*, 2005). Alguns estudos têm sugerido papel importante para a PGD<sub>2</sub> e seu receptor DP1, na prevenção do comportamento pruriginoso em modelos de dermatite atópica em camundongos (Arai *et al.*, 2004; Takaoka *et al.*, 2006). Dados recentes demonstraram que o bloqueio farmacológico, empregando inibidores seletivos, ou genético, utilizando RNA de interferência (RNAi) da enzima COX-1, aumenta a coceira em camundongos NC/Nga, sugerindo uma relação deste fenômeno com a diminuição da produção de PGD<sub>2</sub> na pele (Sugimoto *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos no presente estudo com os antiinflamatórios esteroidal e não-esteroidais nos comportamentos pruriginoso e nociceptivo induzidos pela tripsina, indicam a existência de diferenças farmacológicas entre estes dois modelos, uma vez que o tratamento com ambas as classes de antiinflamatórios foi eficaz sobre a coceira, porém não interferiu com a nocicepção induzida pela enzima. É possível inferir que a ausência de efeito

para ambas as classes de antiinflamatórios sobre a nocicepção esteja relacionada com a curta duração desta resposta, pois em um período de 10 min seria pouco provável haver síntese expressiva de novas proteínas inflamatórias, como por exemplo da COX-2, ao passo que no modelo de prurido a probabilidade de tal fenômeno ocorrer é muito maior. No entanto, pode-se sugerir ainda que as diferenças observadas entre os dois modelos sejam resultantes da presença de diferentes tipos de células residentes, mediadores celulares e/ou subtipos de neurônios sensoriais, na derme (dorso) e tecido subcutâneo (pata), o que poderia diferenciar o perfil de ambas as respostas. Desse modo, estes resultados corroboram aqueles obtidos com as drogas que interferem com o sistema opioidérgico e sustentam a hipótese a respeito do envolvimento preferencial de componentes pruriceptivos no comportamento de coçar induzido pela tripsina em camundongos.

Os mastócitos são células imunes residentes da pele implicadas no desencadeamento de processos nociceptivos e pruriginosos (Sugimoto *et al.*, 1998; Parada *et al.*, 2001; Rukwied *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2005; Barbara *et al.*, 2007; Paszcuk *et al.*, 2008; Marotta *et al.*, 2009). É importante mencionar que estas células podem expressar o receptor PAR-2 (D'Andrea *et al.*, 2000), cuja ativação induz a degranulação e a liberação de mediadores mastocitários. Os mastócitos estocam e liberam de seus grânulos intracelulares uma grande variedade de substâncias com expressiva ação pruriginosa e/ou nociceptiva, como histamina, 5-HT, SP, prostanóides, catepsinas, triptase e quimase. Além disso, periféricamente, os mastócitos estão localizados próximos a vasos sanguíneos e terminações nervosas livres, o que favorece o envolvimento de seus mediadores em processos inflamatórios, dolorosos ou pruriginosos (Toyoda

*et al.*, 2000; Barbara *et al.*, 2007; para revisão, ver Yong *et al.*, 1997; Metcalfe *et al.*, 1997). Uma vez liberados, os produtos de degranulação de mastócitos podem causar ativação e/ou sensibilização de fibras nervosas sensoriais, com consequente liberação de neuropeptídeos, tais como SP e CGRP, levando ao quadro de inflamação neurogênica (para revisão, ver Zegarska *et al.*, 2006). Desse modo, os mastócitos podem desempenhar um papel central na patofisiologia da sensação de coceira. Confirmando estas evidências, os resultados do presente trabalho sugerem um papel crucial para os mastócitos no comportamento de coçar induzido pela tripsina em camundongos, uma vez que o pré-tratamento diário com o estabilizador da membrana de mastócitos, cromoglicato de sódio, ou com o degranulador de mastócitos, composto 48/80, foi capaz de bloquear parcialmente a resposta pruriginosa da enzima. Estes resultados confirmam dados prévios demonstrando o envolvimento de mastócitos no comportamento de coçar induzido por diferentes agentes em roedores (Sugimoto *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 2005; Trentin, 2006; Yamashita *et al.*, 2007). Curiosamente, a nocicepção espontânea induzida pelo fragmento SLIGRL-NH<sub>2</sub> em ratos é um evento independente da degranulação de mastócitos (Kawabata *et al.*, 2001a; 2002). No entanto, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que os efeitos nociceptivos da tripsina administrada na pata de camundongos, são reduzidos pelo pré-tratamento com composto 48/80 ou com cromoglicato de sódio (Paszczuk *et al.*, 2008).

A histamina é o mediador mastocitário melhor conhecido por causar coceira em humanos (Schmelz *et al.*, 1997; 2003; Rukwied *et al.*, 2000; Andrew e Craig, 2001) e em animais de experimentação (Kuraishi *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2006; Shim *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2008). A participação do receptor H<sub>1</sub> para

a histamina na coceira tem sido extensivamente estudada e caracterizada em diferentes condições experimentais, tanto em humanos quanto em roedores (para revisão, ver Shim e Oh, 2008). Os antagonistas do receptor H<sub>1</sub>, os chamados anti-histamínicos, são amplamente usados no alívio da coceira associada com algumas condições clínicas, apesar da ineficiência do tratamento para alguns pacientes (para revisão ver Klein *et al.*, 1999; Herman e Vender, 2003; Cies e Giamalis, 2007). Além disso, a eficácia destes compostos é controversa, uma vez que alguns estudos sugerem que estes efeitos sejam dependentes da ação sedativa dos anti-histamínicos, enquanto que outros trabalhos mostram que moléculas incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BBB) são igualmente eficazes (Klein *et al.*, 1999). Em modelos animais de prurido agudo, o bloqueio farmacológico do receptor H<sub>1</sub>, pelo emprego de antagonistas seletivos capazes de atravessar a BBB, mas não pelo uso de compostos não-sedativos, foi capaz de interferir com o comportamento de coçar induzido pela histamina ou composto 48/80 (Sugimoto *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 2004; Dunford *et al.*, 2007). Ainda, é importante mencionar que a administração i.d. do agonista seletivo para o receptor H<sub>1</sub> (HTMT) produz comportamento de coçar em camundongos, uma resposta que depende da ativação de receptores H<sub>1</sub> localizados em fibras sensoriais do tipo C e da ativação da FLCβ3 (Bell *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2006). Os resultados do presente trabalho indicam que o comportamento pruriginoso deflagrado pelos agonistas do PAR-2 é independente do receptor H<sub>1</sub> para a histamina, uma vez que o pré-tratamento com os anti-histamínicos, pirlamina (sedativo) ou loratadina (não-sedativo), não foi capaz de interferir com a resposta aos agonistas. Confirmando estes resultados, dados recentes da literatura demonstram que o tratamento

com antagonistas seletivos para o receptor H<sub>1</sub> histaminérgico é ineficaz sobre a coceira induzida pelo fragmento agonista do PAR-2, SLIGRL-NH<sub>2</sub> (Shimada *et al.*, 2006; Tsujii *et al.*, 2008). Além disso, outros modelos experimentais de prurido agudo em roedores parecem ser independentes de mecanismos histaminérgicos, mediados pelo receptor H<sub>1</sub> (Hayashi *et al.*, 2001; Andoh *et al.*, 2002). Cabe destacar que a nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de tripsina em camundongos é independente do receptor H<sub>1</sub> histaminérgico (Paszczuk, 2007). Com base nestes resultados, é possível inferir que a administração i.d. de agonistas do PAR-2 pode ser utilizada como um modelo experimental de prurido, visando a triagem de novas abordagens terapêuticas destinadas a condições clínicas onde os anti-histamínicos não apresentam eficácia desejada.

A principal função fisiológica do receptor H<sub>2</sub> para a histamina é regular a liberação de ácido gástrico no estômago (Parsons e Ganellin, 2006), embora alguns estudos também tenham sugerido o envolvimento deste receptor no prurido (Hagermark *et al.*, 1979; Davies *et al.*, 1980). No entanto, a administração i.d. de dimaprite, agonista seletivo para o receptor H<sub>2</sub>, não causou comportamento sugestivo de prurido em camundongos (Bell *et al.*, 2004). Além disso, os antagonistas seletivos para os receptores H<sub>2</sub>, cimetidina ou ranitidina, não são capazes de bloquear o comportamento pruriginoso induzido pela administração i.d. de histamina (Bell *et al.*, 2004; Dunford *et al.*, 2007). Estes dados da literatura sugerem uma participação inexpressiva do receptor H<sub>2</sub> na transmissão da coceira em roedores, bem como dão suporte para os resultados aqui apresentados. Desta forma, no presente trabalho foi verificado que ambos os antagonistas H<sub>2</sub>, cimetidina e ranitidina, em doses apropriadas, não foram

eficazes sobre o comportamento de coçar induzido pela tripsina, sugerindo que esta resposta é independente da ativação deste receptor.

Recentemente, alguns trabalhos demonstraram o envolvimento do receptor H<sub>3</sub> histaminérgico em modelos de prurido agudo em animais de experimentação. No entanto, esta resposta é causada pelo bloqueio, e não pela ativação, do receptor H<sub>3</sub> (Sugimoto *et al.*, 2000; 2004; Hossen *et al.*, 2003; 2006). No presente trabalho, o pré-tratamento sistêmico com iodofenpropite, antagonista seletivo para o receptor H<sub>3</sub> histaminérgico, em dose adequada, não foi capaz de interferir significativamente com a resposta pruriceptiva evocada pela tripsina. Dados da literatura tem demonstrado que a administração i.d. no dorso de camundongos de antagonistas seletivos para o receptor H<sub>3</sub>, mas não do agonista seletivo, causa acessos de coceira ao sítio injetado, uma resposta que parece ser independente de mastócitos e de histamina (Sugimoto *et al.*, 2000; 2004; Hossen *et al.*, 2003), mas que envolve a participação de SP e do seu receptor NK<sub>1</sub> (Hossen *et al.*, 2006). Além disso, Hossen e colaboradores (2004) reportaram que o tratamento sistêmico com o agonista seletivo para o receptor H<sub>3</sub> (α-metil-histamina) previne de maneira dependente da dose o comportamento de coçar induzido pelos antagonistas H<sub>3</sub>, tioperamida e AQ0145. Uma possível explicação para este fenômeno consiste no fato de que o receptor H<sub>3</sub>, expresso em células neuronais e localizado pré-sinápticamente, atua como um auto-receptor regulando a liberação de histamina e de outros neurotransmissores (Parsons e Ganellin, 2006; Thurmond *et al.*, 2008). Desse modo, a participação do receptor H<sub>3</sub> na resposta pruriginosa induzida pelos agonistas do PAR-2 não pode ser completamente descartada, uma vez que o emprego de um agonista seletivo para este

receptor não foi averiguado e parece ser uma estratégia farmacológica adequada para se estudar a participação deste receptor em respostas pruriginosas.

A descoberta de um novo subtipo de receptor para a histamina, o receptor H<sub>4</sub>, foi recentemente descrita (Oda *et al.*, 2000). Este receptor vem sendo considerado como um alvo promissor no desenvolvimento de novos anti-histamínicos para o tratamento de condições inflamatórias, alérgicas e pruriginosas (para revisão, ver Thurmond *et al.*, 2008). Os dados do presente estudo sugerem o envolvimento do receptor H<sub>4</sub> histaminérgico no comportamento de coçar induzido pelos agonistas do PAR-2, uma vez que o pré-tratamento com tioperamida, antagonista não-seletivo dos receptores H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>, mas não com iodofenpropite, antagonista seletivo para o receptor H<sub>3</sub>, interferiu significativamente com a resposta pruriginosa causada por estes agentes. Previamente, Bell e colaboradores (2004), utilizando tioperamida como ferramenta farmacológica, sugeriram o envolvimento do receptor H<sub>4</sub> histaminérgico no comportamento de coçar induzido pela histamina em camundongos. Posteriormente, Dunford e colaboradores (2007) verificaram a eficácia do antagonista seletivo para o receptor H<sub>4</sub>, JNJ7777120, no prurido experimental induzido pela histamina ou pelo composto 48/80. Além disso, animais com deleção gênica para o receptor H<sub>4</sub> apresentaram menor resposta pruriginosa em comparação aos animais selvagens após a injeção i.d. de histamina ou composto 48/80 (Dunford *et al.*, 2007). Em uma publicação atual, Rossbach e colaboradores (2008) verificaram que o tratamento com JNJ7777120 foi eficaz em prevenir o prurido associado ao modelo de dermatite atópica induzida por hapteno. Além disso, estes estudos têm sugerido que a



combinação entre antagonistas para os receptores H<sub>1</sub> e H<sub>4</sub> pode constituir uma alternativa mais eficaz sobre o comportamento pruriginoso deflagrado por diferentes agentes, em comparação ao monotratoamento (Dunford *et al.*, 2007; Rossbach *et al.*, 2008).

A 5-HT, também encontrada em mastócitos, pode causar excitação de fibras sensorias do tipo C (Beck e Handwerker, 1974, citado por Ständer *et al.*, 2003), contribuindo para estados nociceptivos (Kayser *et al.*, 2007). Além disso, este mediador pode causar prurido quando injetado ou aplicado por iontoforese em humanos ou, quando administrado por via i.d. em camundongos (Yamaguchi *et al.*, 1999; Thomsen *et al.*, 2001; 2002). No entanto, este efeito da 5-HT em roedores parece não depender de fibras sensoriais que expressam receptores TRPV1 (Shim *et al.*, 2007). Em humanos, a coceira induzida pela 5-HT parece ser mediada pela ativação de receptores 5-HT<sub>3</sub>; apesar disso, antagonistas seletivos para este receptor não apresentaram eficácia em estudos clínicos (Murphy *et al.*, 2003; Weisshaar *et al.*, 2003, citados por Ständer *et al.*, 2003). Curiosamente, o efeito pruriginoso da 5-HT em roedores parece ser dependente de receptores 5-HT<sub>2</sub> cutâneos, mas não do subtipo 5-HT<sub>3</sub> (Yamaguchi *et al.*, 1999; Nojima *et al.*, 2003). De fato, o pré-tratamento com ciproeptadina, antagonista misto de receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>2</sub>/5-HT<sub>1C</sub>) e histaminérgicos (H<sub>1</sub>), bloqueou a resposta pruriceptiva induzida por diferentes estímulos em camundongos (Inagaki *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). Neste estudo, também observamos um possível envolvimento da 5-HT no prurido induzido pela tripsina, uma vez que o pré-tratamento com ciproeptadina, mas não com pirlamina ou loratadina, preveniu de modo significativo a resposta da enzima. Assim, os resultados do presente trabalho

confirmam e estendem os dados da literatura acerca do envolvimento de receptores 5-HT<sub>2</sub> serotoninérgicos na resposta pruriginosa em camundongos.

A liberação proteases mastocitárias, como quimase, catepsina G, calicreínas e principalmente triptase, pode contribuir para a coceira (Steinhoff *et al.*, 2003; Ui *et al.*, 2006). Previamente, foi demonstrado que a administração de quimase na pele pode causar sensação de coceira em humanos (Hägermark *et al.*, 1972). Do mesmo modo, a injeção i.d. de tripsina em voluntários saudáveis causa prurido, ainda que em menor intensidade que a histamina (Thomsen *et al.*, 2002). Os resultados deste estudo indicam o envolvimento de proteases no comportamento de coçar induzido por ambos os ativadores do PAR-2, uma vez que o tratamento sistêmico com o inibidor não seletivo de proteases, gabexato mesilato, inibiu a coceira induzida por estes agentes. Inicialmente, seria possível sugerir que o efeito do gabexato sobre o modelo da tripsina estaria associado com a inibição do próprio agente pruriginoso. No entanto, a eficácia deste inibidor contra a ação pruriginosa do agonista SLIGRL-NH<sub>2</sub>, sugere o envolvimento da liberação adicional de proteases, possivelmente de origem mastocitária. Ui e colaboradores (2006) verificaram que a administração i.d. de triptase, mas não de quimase, no dorso de camundongos produziu comportamento sugestivo de coceira e que essa resposta é inibida pelo pré-tratamento sistêmico um inibidor de serino-proteases. Além disso, estes autores também sugeriram um importante papel para proteases liberadas por mastócitos, via ativação do PAR-2, na gênese do comportamento pruriginoso induzido pelo composto 48/80 (Ui *et al.*, 2006). Recentemente, foi sugerido o potencial anti-pruriginoso de inibidores para a quimase em um modelo de dermatite atópica em camundongos (Terakawa *et*

*al.*, 2008). Por fim, o envolvimento de calicreínas na coceira induzida por deoxicolato de sódio em ratos foi previamente proposto (Hayashi e Majima, 1999). Curiosamente, foi demonstrado que algumas isoformas de calicreínas, presentes na epiderme de humanos, podem ativar o receptor PAR-2 *in vitro* (Stefansson *et al.*, 2006). Ademias, camundongos transgênicos super-expressando a calicreína-7 epidérmica apresentam comportamento pruriginoso (Hy e Egelrud, 2004). Em conjunto com os dados da literatura, os resultados do presente estudo sugerem a existência de um fenômeno cíclico de liberação de proteases que contribui para o processo pruriginoso. Nesse sentido, pode-se propor que a liberação ou aplicação de proteases na pele, principalmente de triptase de mastócitos, leva à degranulação destas células, possivelmente via clivagem e ativação do PAR-2, com consequente liberação adicional de outras enzimas proteolíticas que intensificam a resposta pruriginosa.

O receptor PAR-2 é expresso em neurônios sensoriais não-mielinizados de pequeno e médio diâmetro, co-localizado com o receptor TRPV1 e com neuropeptídeos, tais como SP e CGRP (Steinhoff *et al.*, 2000; Amadesi *et al.*, 2004). Recentemente, foi demonstrado que agonistas do PAR-2 podem sensibilizar o receptor TRPV1 e causar excitação neuronal (Amadesi *et al.*, 2004; 2006). Estes achados dão suporte para o envolvimento do PAR-2 nos fenômenos de nocicepção e hiperalgesia descritos previamente (Hoogerwerf *et al.*, 2001; Kawabata *et al.*, 2001a; Vergnolle *et al.*, 2001). Além disso, estudos em humanos e em animais de experimentação sugerem a existência de um subtipo de fibra C especializada na condução da sensação de coceira (Schmelz *et al.*, 1997; Andrew e Craig, 2001). Sendo assim, neste estudo, a fim de verificar o envolvimento de fibras sensoriais do tipo C na resposta comportamental de

coçar causada pelos agonistas do PAR-2, camundongos foram submetidos ao protocolo de dessensibilização neonatal com capsaicina ou ao tratamento adulto com RTX, um análogo ultrapotente da capsaicina. Ambas estratégias farmacológicas causam dessensibilização de fibras sensoriais que expressam o receptor TRPV1 (predominantemente fibras C), podendo até mesmo ocorrer degeneração irreversível de terminais nervosos. Os achados do presente trabalho fornecem evidências sugerindo o envolvimento de fibras sensíveis à capsaicina na resposta pruriginosa induzida pelos agonistas do PAR-2 em camundongos, uma vez que a dessensibilização neonatal preveniu os acessos de coceira induzidos pela tripsina, assim como o tratamento com RTX reduziu o prurido induzido pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub>. Estes resultados estão de acordo com dados prévios demonstrando que a dessensibilização neonatal com capsaicina preveniu o comportamento pruriginoso induzido pela histamina, composto 48/80 e endotelina em camundongos (Trentin, 2006). Além disso, a resposta pruriginosa evocada pela histamina em roedores é dependente de receptores H<sub>1</sub> localizados em fibras C sensoriais (Han *et al.*, 2006).

O papel de fibras sensoriais do tipo C no prurido desencadeado pela ativação do receptor PAR-2 também foi confirmado pela caracterização do envolvimento do receptor TRPV1 neste modelo. O tratamento sistêmico ou local com SB366791, antagonista seletivo para o receptor TRPV1, reduziu significativamente as respostas induzidas pela tripsina ou pelo fragmento peptídico SLIGRL-NH<sub>2</sub>. Confirmando estes resultados, animais com deleção gênica para o receptor TRPV1 (TRPV1<sup>-/-</sup>) apresentaram menor comportamento pruriginoso em comparação ao grupo controle selvagem (TRPV1<sup>+/+</sup>). De maneira relevante, Shim e colaboradores (2007), através do emprego ferramentas

farmacológicas e genéticas (animais TRPV1<sup>-/-</sup>), demonstraram que o prurido provocado pela histamina em camundongos é mediado pelo receptor TRPV1, via ativação de fosfolipase A<sub>2</sub> e lipoxigenase. Além disso, estes autores também demonstraram que a ativação do TRPV1 pela histamina em neurônios sensoriais é mediada pela síntese do ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico (12-HPETE), um metabólito da 12-lipoxigenase e ativador endógeno do TRPV1 (Hwang *et al.*, 2000; Shim *et al.*, 2007). Concordando com estes achados, foi previamente demonstrado que a injeção i.d. de 12-HPETE evocou comportamento de coçar em camundongos (Kim *et al.*, 2007). Entretanto, esta relação entre TRPV1 e 12-HPETE é controversa, uma vez que o prurido induzido por 12-HPETE não foi bloqueado pelo tratamento com capsazepina, um antagonista para o TRPV1 (Kim *et al.*, 2008). Porém, o tratamento tópico com capsaicina reduz os acessos de coceira induzidos por 12-HPETE (Kim *et al.*, 2007), possivelmente pela dessensibilização do TRPV1. A aplicação tópica de cremes a base de capsaicina têm sido utilizada como uma alternativa para o alívio da coceira associada com algumas condições clínicas (Ständer *et al.*, 2001). Ainda, é relevante mencionar que o comportamento nociceptivo gerado pela injeção i.pl. de tripsina em camundongos é dependente da ativação do receptor TRPV1, já que o antagonista seletivo para este receptor, SB366791, reverte parcialmente a nocicepção espontânea induzida pela enzima. Todavia, em confronto com estes dados, Kawao e colaboradores (2002) demonstraram que o comportamento nociceptivo gerado pela administração i.pl. do peptídeo SLIGRL-NH<sub>2</sub> em ratos não foi alterado pelo tratamento com capsazepina. Os resultados aqui apresentados confirmam e ampliam dados prévios da literatura relacionados com o envolvimento de fibras sensoriais do tipo C e do receptor

TRPV1 na resposta comportamental desencadeada por agentes pruriginosos em roedores, e mais uma vez demonstram a participação do TRPV1 nas respostas sensoriais desencadeadas pela ativação do receptor PAR-2.

Está bem documentado na literatura o envolvimento de mediadores da inflamação neurogênica, como SP e CGRP, nas respostas inflamatórias e nociceptivas mediadas pelo receptor PAR-2 (Steinhoff *et al.*, 2000; Kawabata *et al.*, 2001a; Hoogerwerf *et al.*, 2001; Amadesi *et al.*, 2004; 2006; Su *et al.*, 2005; Obreja *et al.*, 2006). Em uma recente publicação do nosso grupo, Paszcuk e colaboradores (2008) demonstraram que o *licking* induzido pela tripsina é dependente dos neuropeptídeos NKA e NKB, SP e CGRP. Além disso, a contribuição de neuropeptídeos para coceira associada a diferentes condições clínicas, como dermatite atópica ou psoríase, têm sido extensivamente estudada (Glinski *et al.*, 1994; Ostlere *et al.*, 1995; Thomsen *et al.*, 2002; Remröd *et al.*, 2007). Ainda, a participação destes mediadores em modelos experimentais de prurido em roedores também foi relatada recentemente (Costa *et al.*, 2005; Yamaoka *et al.*, 2007; Yamaoka e Kawana, 2007a; 2007b). Em conformidade com os dados da literatura, os resultados do presente trabalho demonstram que o pré-tratamento sistêmico com antagonistas dos receptores para SP (receptor NK<sub>1</sub>), NKB (receptor NK<sub>3</sub>) e CGRP (receptor CGRP<sub>1</sub>), mas não para NKA (receptor NK<sub>2</sub>), preveniu os acessos de coceira induzidos pela tripsina em camundongos. Estes neuropeptídeos parecem estar envolvidos localmente, já que o co-tratamento i.d. com os antagonistas dos receptores NK<sub>1</sub> ou CGRP<sub>1</sub> também inibiram a coçadura induzida pelo fragmento peptídico SLIGRL-NH<sub>2</sub>. Estes dados estão de acordo com resultados prévios demonstrando que ativadores de receptores PAR, tripsina e trombina, podem estimular diretamente a liberação

de NKs e CGRP a partir da pele de ratos (Obreja *et al.*, 2006). Vale mencionar que tripsina e triptase, atuando sobre receptores PAR-2, estimulam a liberação de neuropeptídeos a partir de fatias da medula espinhal de roedores (Steinhoff *et al.*, 2000; Hoogerwerf *et al.*, 2001; Amadesi *et al.*, 2004; 2006).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a administração i.d. de SP causa comportamento pruriginoso em camundongos e coceira em humanos (Kuraishi *et al.*, 1995; Andoh e Kuraishi, 2003; Thomsen *et al.*, 2002; Takubo *et al.*, 2006; Hosogi *et al.*, 2006). Em roedores, esse efeito é mediado pelo receptor NK<sub>1</sub> e parece depender da produção de leucotrieno B<sub>4</sub>, via ativação da 5-lipoxigenase, bem como da produção de óxido nítrico (Andoh *et al.*, 2001; Andoh e Kuraishi, 2003; 2006). Além disso, o efeito pruriginoso da SP em camundongos é dependente de receptores opioídeos do tipo  $\mu$  e  $\kappa$  localizados em nível supraespinhal (Togashi *et al.*, 2002; Umeuchi *et al.*, 2003). O papel da SP também foi demonstrado em modelos de coceira em camundongos induzida pela injeção i.d. de 5-HT, do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*, de antagonistas do receptor H<sub>3</sub> histaminérgico, ou ainda pela estimulação mecânica da pele (Cuellar *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2005; Hossen *et al.*, 2006; Yamaoka e Kawana, 2007a; 2007b; Yamaoka *et al.*, 2007). Além disso, o envolvimento deste neuropeptídeo no prurido relacionado ao modelo de dermatite atópica em camundongos NC/Nga também foi previamente demonstrado (Ohmura *et al.*, 2004).

Embora SP e CGRP normalmente atuem em conjunto em estados inflamatórios e nociceptivos, já que estão co-localizados em fibras sensoriais peptidérgicas e a liberação de um é frequentemente acompanhada da liberação do outro (para revisão ver Zegarska *et al.*, 2006), e apesar de algumas

evidências sugerindo um papel relevante para o CGRP em condições pruriginosas em humanos (Abadía-Molina *et al.*, 1992), poucos trabalhos demonstram o envolvimento deste neuropeptídeo em modelos animais de prurido (Ständer *et al.*, 2006; Yamaoka *et al.*, 2007). Além disso, ao que parece, estudos avaliando os efeitos da administração i.d. de CGRP sobre a coceira em humanos ou comportamento de coçar em camundongos ainda não foram realizados. No entanto, foi sugerido recentemente que a liberação de CGRP, em combinação com SP, pode ser responsável pelo prurido inicial (efeito adverso) observado após a aplicação tópica dos inibidores da calcineurina, pimecrolimus e tacrolimus (Ständer *et al.*, 2006), uma nova classe de antiinflamatórios eficientes no tratamento da inflamação e prurido associados com a dermatite atópica. Curiosamente, foi demonstrado que a estimulação mecânica da pele é capaz de gerar comportamento pruriginoso em camundongos, acompanhado de aumento da imuno-reatividade para SP e CGRP (Yamaoka *et al.*, 2007). No entanto, apesar da resposta pruriginosa neste modelo ser reduzida pelo tratamento com o antagonista para o receptor NK<sub>1</sub>, L-703606, a administração do antagonista seletivo para o receptor CGRP<sub>1</sub>, fragmento CGRP<sub>8-37</sub>, não altera o comportamento de coçar induzido pelo atrito da pele (Yamaoka e Kawana, 2007a).

Um papel menos relevante para as NKA e NKB no prurido tem sido relatado, e estudos em animais de experimentação relacionando o envolvimento destas taquicininas com o comportamento pruriginoso não foram demonstrados. Apesar da falta de eficácia do tratamento com o antagonista seletivo para o receptor NK<sub>2</sub>, observada neste estudo, a premissa do envolvimento da NKA nas ações pruriginosas desencadeadas pela ativação do



PAR-2 é sustentada por dados prévios demonstrando o envolvimento do receptor NK<sub>2</sub> na resposta contrátil da musculatura lisa intestinal (*in vitro*) induzida pela tripsina ou pelo SLIGRL-NH<sub>2</sub>, ou na secreção gástrica em ratos induzida pelo peptídeo agonista do PAR-2 (Kawabata *et al.*, 2001b, Zhao e Shea-Donohue, 2003). Além disso, Thomsen e colaboradores (2002) relataram que a administração i.d. de NKA na pele não inflamada de humanos causa coceira, embora esse efeito seja menos pronunciado do que aquele obtido para a histamina ou SP. No entanto, estes autores também demonstraram que a aplicação de NKB não é capaz de causar os mesmos efeitos (Thomsen *et al.*, 2002). Contudo, os resultados deste trabalho demonstram um papel relevante para a NKB na coceira desencadeada pela ativação do PAR-2 em camundongos, e parecem ser os primeiros dados da literatura sugerindo a participação deste peptídeo, e do seu receptor NK<sub>3</sub>, nos efeitos celulares mediados por este receptor.

Trabalhos têm sugerido o envolvimento do sistema calicreína-cininas na fisiopatologia da coceira (Rajakulasingam *et al.*, 1991; Hayashi e Majima, 1999; Schmelz *et al.*, 2003; Hosogi *et al.*, 2006). Estudos em camundongos, realizados por Hayashi e Majima (1999), demonstraram que o comportamento pruriginoso induzido pela administração i.d. de deoxicolato de sódio no dorso de camundongos conta com a importante participação de componentes do sistema calicreínas-cininas. Estes autores verificaram que o tratamento com antagonistas seletivos para o B<sub>2</sub>R, Hoe 140 ou FR173657, previne os acessos de coceira induzidos pelo deoxicolato de sódio. Ainda, o envolvimento de cininogênios, calicreína tecidual e cininases também foi sugerido por estes autores (Hayashi e Majima, 1999). No presente trabalho, foi verificado que o pré-

tratamento sistêmico de camundongos *Swiss* com os antagonistas seletivos peptídico e não-peptídico do B<sub>2</sub>R para as cininas, Hoe 140 e FR173657, respectivamente, foi capaz de prevenir os acessos de coceira induzidos pelos distintos agonistas do receptor PAR-2. Confirmando estes resultados, animais com deleção do gene para o B<sub>2</sub>R (B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>) apresentaram diminuição expressiva do comportamento pruriginoso induzido por estes mesmos agentes, quando comparados aos animais selvagens (B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup>).

Os resultados do presente trabalho constataram também a participação do B<sub>2</sub>R na nocicepção espontânea induzida pela administração i.pl. de tripsina, uma vez que animais nocaute para este receptor apresentaram redução no tempo de lamber a pata injetada quando comparados ao grupo controle. Estes resultados confirmam os dados de uma publicação recente do nosso grupo, demonstrando que o tratamento com FR173657, antagonista seletivo do B<sub>2</sub>R, inibiu o comportamento nociceptivo induzido pela tripsina em camundongos (Paszczuk *et al.*, 2008). De modo relevante, o envolvimento do B<sub>2</sub>R para as cininas na hiperalgesia colônica induzida por agonistas do PAR-2 foi previamente sugerido (Kawabata *et al.*, 2006). Ademais diversos trabalhos da literatura têm demonstrado a contribuição do B<sub>2</sub>R cininérgico para a nocicepção induzida por diferentes agentes em roedores (Corrêa *et al.*, 1996; Griesbacher *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 1999; Chichorro *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2005). De modo interessante, estudos utilizando animais nocaute para os B<sub>2</sub>R, verificaram a participação deste receptor no comportamento nociceptivo induzido pela injeção i.pl. de agonistas do B<sub>2</sub>R, mas não de formalina (primeira e segunda fases), em camundongos (Boyce *et al.*, 1996; Rupniak *et al.*, 1997).

No presente trabalho, o tratamento com, Hoe 140, antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R, administrado por diferentes vias (i.d., i.t. ou i.c.v.), revelou importante contribuição destes receptores localizados na pele (via i.d.) e, principalmente na medula espinhal (via i.t.), mas não em níveis supra-espinhais (via i.c.v.), na resposta pruriginosa desencadeada pelo agonista do PAR-2. Embora estudos investigando o possível efeito pruriginoso da injeção i.d. de agonistas do B<sub>2</sub>R em animais de experimentação ainda não tenham sido realizados, a injeção i.pl. de BK ou de Tyr<sup>8</sup>-BK, agonistas seletivos para o B<sub>2</sub>R, causou nocicepção espontânea em camundongos ou ratos, uma resposta que parece ser mediada por B<sub>2</sub>R constitutivos na periferia (Boyce *et al.*, 1996; Griesbacher *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2004). O comportamento nociceptivo induzido pela injeção de formalina ou PMA na pata de camundongos também parece ser mediado por B<sub>2</sub>R constitutivos localizados na pele (Corrêa *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2005).

Existem evidências demonstrando que a BK pode ser produzida, a partir do cininogênio, pela ação proteolítica da triptase de mastócitos (Kozik *et al.*, 1998), e de promover degranulação mastocitária. Os mastócitos, células importantes nos processos pruriginosos, também podem liberar calicreínas (Imamura *et al.*, 2004), as quais também podem ser responsáveis pela produção local de BK. Vários estímulos inflamatórios podem levar a liberação e/ou produção local de BK ou calidina que, atuando sobre B<sub>2</sub>R constitutivos presentes em fibras C e A $\delta$ , podem ativar e/ou sensibilizar diretamente os nociceptores ou, ainda, através da liberação de outros mediadores de células neuronais e não-neuronais, como PGs, citocinas ou óxido nítrico. Ainda, as cininas atuando sobre os aferentes primários podem causar a liberação de neuropeptídeos tais como

SP e CGRP, favorecendo o desenvolvimento de inflamação neurogênica. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a bradicinina, via ativação do B<sub>2</sub>R, pode sensibilizar o receptor TRPV<sub>1</sub> indiretamente, por meio da produção de substâncias endógenas, como produtos da lipoxigenase e cicloxigenase, ou ainda por ativar a proteína quinase C (Dray e Perkins, 1997; Calixto *et al.*, 2000; 2001; Couture *et al.*, 2001). Corroborando estes resultados *in vitro*, Ferreira e colaboradores (2005) demonstraram que a nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de bradicinina em camundongos é mediada pela estimulação do B<sub>2</sub>R, via ativação de fosfolipase C e formação de produtos da lipoxigenase.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a injeção i.t. de Hoe 140, antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R, causou redução expressiva no número de acessos de coceira no sítio injetado com SLIGRL-NH<sub>2</sub>, uma resposta comparável aos efeitos da deleção gênica deste receptor sobre o comportamento pruriginoso. Estes dados indicam que os B<sub>2</sub>R localizados na medula espinhal parecem ser importantes alvos para o desencadeamento da resposta pruriginosa induzida pela ativação do PAR-2 na periferia. De acordo com estes resultados, foi demonstrado previamente por Dray e colaboradores (1988), a partir de estudos *in vitro*, que a BK causa despolarização de neurônios na medula espinhal isolada de ratos neonatos através de B<sub>2</sub>R. Recentemente, Ferreira e colaboradores (2004) verificaram que a injeção i.t. de agonistas seletivos dos B<sub>2</sub>R, BK ou Tyr<sup>8</sup>-BK, causa hiperalgesia térmica em camundongos. Além disso, a injeção i.t. do antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R Hoe 140 é capaz de inibir a segunda fase na nocicepção espontânea induzida pela formalina em ratos, e ambas as fases em camundongos (Chapman e Dickenson, 1992; Ferreira *et al.*, 2002).

Apesar da eficácia obtida para os antagonistas do B<sub>2</sub>R sobre o comportamento pruriginoso desencadeado pelo deoxicolato de sódio em camundongos (Hayashi e Majima, 1999), este mesmo estudo demonstrou que o tratamento local com DALBK, antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R, não foi efetivo sobre a coceira induzida por este agente, excluindo o envolvimento do B<sub>1</sub>R nesta resposta comportamental (Hayashi e Majima, 1999). De modo contrário, os resultados apresentados aqui demonstram o envolvimento do B<sub>1</sub>R para as cininas no prurido induzido pelos ativadores do PAR-2, já que o pré-tratamento sistêmico com SSR24612, antagonista seletivo e não-peptídico para o B<sub>1</sub>R, embora não com DALBK, antagonista seletivo e peptídico, reduziu o número de acessos de coceira ao sítio injetado com tripsina ou SLIGRL-NH<sub>2</sub>. Considerando a natureza peptídica da DALBK pode-se sugerir que a falta de eficácia deste antagonista seja devido a sua maior instabilidade e suscetibilidade a degradação *in vivo*. Posteriormente, os resultados farmacológicos foram confirmados pelo emprego de animais nocaute para o B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>), nos quais a administração i.d. de agonistas do PAR-2 gerou menor número de acessos de coceira em comparação aos animais selvagens.

Outro resultado interessante obtido neste estudo foi a constatação do envolvimento do B<sub>1</sub>R para as cininas na nocicepção espontânea induzida pela administração i.pl. de tripsina, onde animais nocaute para este B<sub>1</sub>R (B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>) apresentaram redução no tempo de lambida da pata injetada quando comparados aos camundongos controle selvagens. Sendo assim, do mesmo modo que para o B<sub>2</sub>R, estes resultados demonstram o envolvimento do B<sub>1</sub>R não somente no comportamento pruriginoso, mas também na resposta nociceptiva, desencadeada pela ativação do PAR-2. Em uma publicação recente do nosso

grupo, Paszcuk e colaboradores (2008) demonstraram que o pré-tratamento com o antagonista seletivo e não-peptídico para os B<sub>1</sub>R (SSR240612) não foi eficaz sobre o comportamento nociceptivo induzido pela tripsina em camundongos. A discrepância entre os resultados acerca do envolvimento do B<sub>1</sub>R no *licking* induzido pela tripsina em ambos os trabalhos, poderia ser atribuída as diferentes linhagens de camundongos utilizadas, ou seja, animais C57BL/6 selvagens e nocautes para os receptores cininérgicos, no presente estudo, e camundongos Swiss no trabalho anteriormente publicado (Paszcuk *et al.*, 2008).

O envolvimento do B<sub>1</sub>R para as cininas em modelos experimentais agudos de nocicepção tem sido sugerido (para revisão ver Calixto *et al.*, 2004). O tratamento com antagonistas seletivos para este receptor foram eficazes sobre a nocicepção orofacial induzida pela formalina em ratos (Chichorro *et al.*, 1999), e também foram capazes de reduzir a nocicepção espontânea induzida pela injeção i.pl. de capsaicina, glutamato, formalina (primeira e segunda fase) ou PMA (Sufka e Roach, 1996; Rupniak *et al.*, 1997; Shibata *et al.*, 1999; Beirith *et al.*, 2003; Gougat *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2008). Ainda, animias nocaute para o B<sub>1</sub>R apresentaram comportamento nociceptivo reduzido à aplicação i.pl. de capsaicina, formalina ou PMA (Pesquero *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2008). Desde que o comportamento nociceptivo desencadeado pela maioria destes agentes tem uma curta duração (não mais do que 10 min), e pelo fato da administração periférica de agonistas para o B<sub>1</sub>R raramente causar nocicepção em animais *naïve* (Perkins e Kelly, 1994; Fox *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004), parece improvável que a participação deste receptor nestes modelos agudos dependa da síntese *de novo* ou de B<sub>1</sub>R expressos localmente. Sendo assim, pode-se sugerir o envolvimento de B<sub>1</sub>R expressos constitutivamente no sistema nervoso

central. A presença constitutiva do B<sub>1</sub>R em fibras aferentes nociceptivas, e diferentes estruturas do sistema nervoso central, relacionadas à transmissão e à modulação sensorial, tem sido amplamente reportada em diferentes espécies (para revisão ver Calixto *et al.*, 2004).

Com base no exposto, pode-se especular que no atual estudo, tanto a nocicepção espontânea quanto o comportamento pruriginoso evocados pelos agonistas do PAR-2, sejam mediados por B<sub>1</sub>R expressos constitutivamente no sistema nervoso central, particularmente na medula espinhal. Os resultados aqui apresentados demonstram ainda que a injeção i.t., mas não i.d. ou i.c.v, do antagonista seletivo para o B<sub>1</sub>R (DALBK), reduziu significativamente a coceira induzida pelo peptídeo agonista do PAR-2, sugerindo o envolvimento de B<sub>1</sub>R localizados na medula espinhal, mas não na periferia ou no cérebro, nesta resposta comportamental. A administração i.t. de agonistas para o B<sub>1</sub>R induz hiperalgesia após estimulação térmica ou mecânica em roedores (Ferreira *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2003). Além disso, a administração i.t. de DALBK inibiu a segunda fase da nocicepção espontânea induzida pela formalina em camundongos (Ferreira *et al.*, 2002). De modo relevante, Pesquero e colaboradores (2000) demonstraram, a partir estudos *in vitro* usando preparação de medula espinhal, que o B<sub>1</sub>R atua especificamente em sinapses nociceptivas, e que este receptor pode estar envolvido com algumas formas de sensibilização central. Camundongos com deficiência no B<sub>1</sub>R apresentaram hipoalgesia em modelos químicos de nocicepção, provavelmente relacionada com uma redução da facilitação dependente de atividade (*Wind-up*) dos reflexos espinhais nociceptivos (Pesquero *et al.*, 2000).

Apesar dos resultados apresentados aqui sugerirem, em conjunto com os dados da literatura, a participação de B<sub>1</sub>R constitutivos localizados no SNC na resposta pruriginosa mediada pelo PAR-2, o aumento da expressão periférica desta proteína não pode ser descartado até que técnicas de biologia molecular sejam empregadas para confirmar os dados farmacológicos. Neste sentido, cabe destacar que a administração de PMA, um ativador da proteína quinase C, na pata de camundongos causa aumento da proteína, mas não do RNAm, para o B<sub>1</sub>R dentro de 30 min após sua injeção (Ferreira *et al.*, 2008). Além disso, a injeção i.pl. de PMA é capaz de promover comportamento nociceptivo (*licking*), uma resposta que é abolida pelo co-tratamento com DALBK ou pela deleção do gene para o B<sub>1</sub>R (Ferreira *et al.*, 2008).

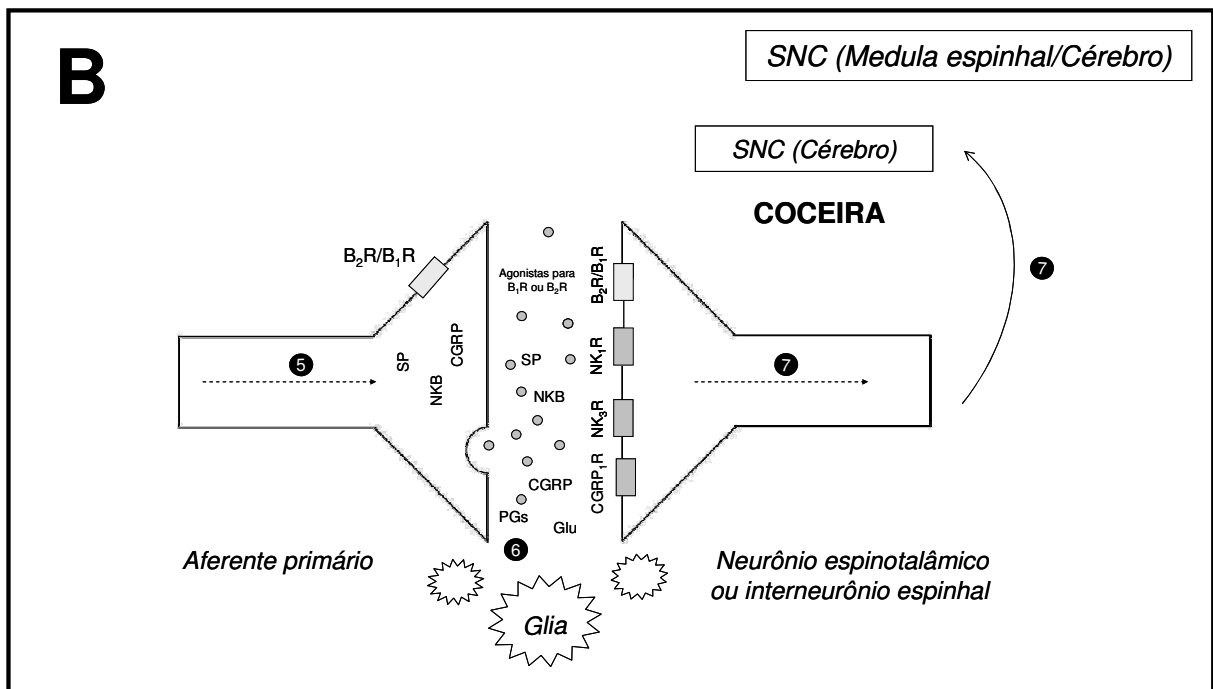
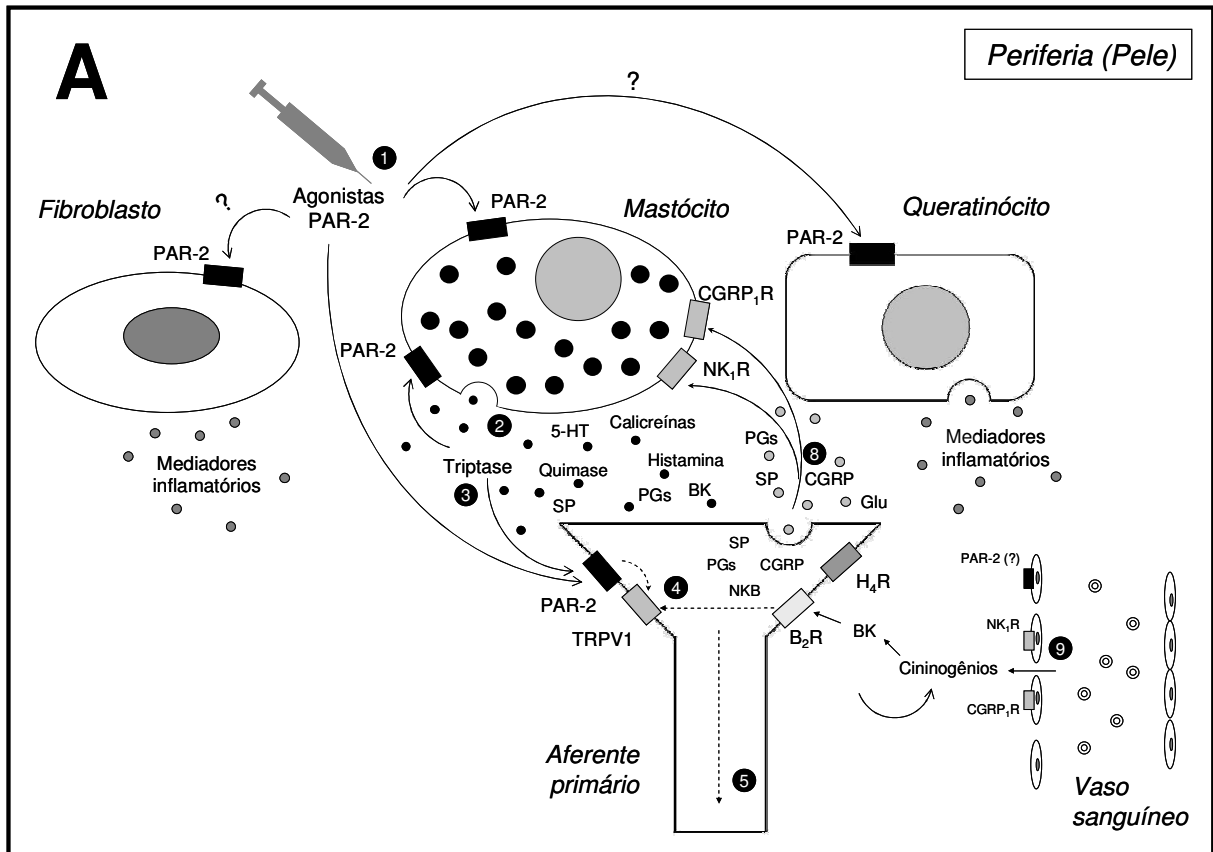
Por fim, com o intuito de verificar o envolvimento dos receptores cininérgicos na resposta comportamental de coçar induzida por outros agentes, avaliou-se o efeito da administração i.d. de três diferentes pruritógenos: deoxicolato de sódio, cloroquina ou composto 48/80, em animais selvagens ou nocautes para os B<sub>2</sub>R ou B<sub>1</sub>R. Os modelos de coceira induzidos pelos dois primeiros agentes procuram mimetizar o prurido em humanos associado a colestase, devido ao acúmulo de sais de bile na pele, ou causado pelo uso de cloroquina, um efeito adverso ao uso deste antimalárico, respectivamente (Hayashi e Majima, 1999; Sun *et al.*, 2007). Ambas as condições são insensíveis ao tratamento com anti-histamínicos e parecem depender do sistema opioidérgico. De modo interessante, os resultados do atual estudo indicam que os B<sub>2</sub>R mediam grandemente o comportamento de coçar induzido pelos três agentes testados, uma vez que animais com deleção gênica para este receptor apresentaram redução expressiva da coçadura induzida pelos diferentes



agentes. Anteriormente, já havia sido descrito o envolvimento deste receptor, mas não do B<sub>1</sub>R, no comportamento pruriginoso evocado pelo deoxicolato de sódio em camundongos (Hayashi e Majima, 1999). Neste trabalho, animais nocaute para o B<sub>1</sub>R apresentaram menor comportamento pruriginoso somente no modelo do composto 48/80, mas não na resposta induzida pelo deoxicolato de sódio ou cloroquina. Curiosamente, o comportamento de coçar induzido pelo composto 48/80, mas não por deoxicolato de sódio ou cloroquina, parece depender também da ativação do PAR-2, já que o antagonista seletivo para este receptor inibiu a resposta pruriginosa evocada por este agente, confirmando dados prévios da literatura (Ui *et al.*, 2006). De fato, estudos têm demonstrado que a degranulação de mastócitos pode levar à liberação de proteases, que atuando sobre receptores PAR-2, contribuem para a coceira (Steinhoff *et al.*, 2003; Ui *et al.*, 2006). Sendo assim, estes resultados sugerem que os B<sub>1</sub>R para as cininas parecem mediar preferencialmente o comportamento pruriginoso dependente da ativação do PAR-2, ao contrário do B<sub>2</sub>R, que demonstrou estar envolvido na coceira experimental induzida por diferentes agentes.

No presente trabalho, foi demonstrado que a administração i.d. de agonistas para o receptor PAR-2 no dorso de camundongos parece promover a ativação de células neuronais e não-neuronais localizadas na pele, com consequente produção ou liberação de diferentes mediadores celulares. Tal efeito parece contribuir predominantemente para a ativação de vias sensoriais envolvidas na transmissão de estímulos pruriginosos para estruturas centrais, desencadeando o reflexo de coçar a pele. Através de ferramentas farmacológicas e moleculares foi claramente demonstrada a participação de

produtos da degranulação de mastócitos, mediadores da inflamação neurogênica e do receptor TRPV1 na resposta comportamental desencadeada pela ativação do PAR-2. Finalmente, o presente estudo apresenta dados consistentes acerca da participação dos B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R para as cininas na coçadura mediada pelo PAR-2. Nossos dados sugerem uma seqüência de eventos (Figura 15A e 15B), onde a injeção de trispina ou do fragmento peptídico SLIGRL-NH<sub>2</sub>, ativa receptores PAR-2 localizados em células neuronais (fibras C), fibroblastos, queratinócitos ou mastócitos, levando a liberação de diferentes moléculas, tais como proteases, 5-HT, histamina (via receptor H<sub>4</sub>), SP, NKB, CGRP, PGs (via ativação de COX-2) e cininas, que atuam em conjunto para ativar e/ou sensibilizar nervos sensoriais, transmitindo a sensação de coceira para estruturas centrais. Os resultados do deste trabalho sugerem que a injeção i.d. de agonistas do receptor PAR-2 no dorso de camundongos pode ser utilizada como um modelo experimental reprodutível para o estudo de alguns mecanismos envolvidos na coceira mediada pela ativação do receptor PAR-2 em roedores, e principalmente como um modelo de triagem farmacológica de novas abordagens terapêuticas para o tratamento do prurido em humanos.



**Figura 15** - Representação esquemática dos possíveis mecanismos, periféricos (A) e centrais (B), envolvidos no comportamento de coçar induzido por agonistas do PAR-2 em camundongos. (1) A injeção i.d. dos agonistas para o PAR-2 pode promover ativação destes receptores localizados em diferentes células residentes da pele, tais como: fibroblastos, queratinócitos, mastócitos e terminações nervosas sensoriais (pruriceptores). (2) A ativação do PAR-2 em mastócitos estimula a liberação de vários mediadores mastocitários, incluindo: histamina, serotonina (5-HT), prostaglandinas (PGs), substância P (SP) e proteases. (3) A

triptase liberada por mastócitos ativa receptores PAR-2 em terminações nervosas ou em outras células residentes, como os próprios mastócitos. **(4)** Mediadores mastocitários ou de outras células inflamatórias (tais como, bradicinina (BK), triptase, SP, 5-HT, histamina, e/ou PGs) podem sensibilizar e/ou ativar o receptor TRPV1 nas terminações nervosas sensoriais, **(5)** gerando um potencial de ação. **(6)** Conseqüentemente, pode ocorrer a liberação ortodrômica de mediadores na medula espinhal, tais como neuropeptídeos (SP, CGRP e NKB), PGs e glutamato (Glu), e possivelmente agonistas para os B<sub>2</sub>R e B<sub>1</sub>R para as cininas. Estes mediadores, atuando sobre receptores específicos localizados no próprio aferente primário, em neurônios espinotalâmicos (ou interneurônios), ou talvez até mesmo em células da glia, podem regular a sua própria liberação (auto-regulação), ou a liberação de outros neurotransmissores; **(7)** facilitando e/ou controlando a transmissão do estímulo pruriginoso para estruturas supraespinhais, resultando no reflexo de coçar a pele. **(8)** A ativação de terminações nervosas sensoriais também pode promover a liberação antidrômica de SP e CGRP, os quais interagem com seus receptores específicos localizados em mastócitos (promovendo degranulação mastocitária) e/ou **(9)** vasos sanguíneos (causando hiperemia e extravasamento plasmático), estabelecendo o quadro de inflamação neurogênica.

## REFERÊNCIAS

- Al-Ani B, Saifeddine M, Wijesuriya SJ, Hollenberg MD (2002). Modified proteinase-activated receptor-1 and -2 derived peptides inhibit proteinase-activated receptor-2 activation by trypsin. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 702-708.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000: 40-56.
- Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F, Karanjia R, Barajas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N, Bunnett NW (2006). Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C epsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol* 575: 555-571.
- Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F, Karanjia R, Barajas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N, Bunnett NW (2006). Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C epsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice. *Physiol* 575: 555-571.
- Andoh T, Katsube N, Maruyama M, Kuraishi Y (2001). Involvement of leukotriene B(4) in substance P-induced itch-associated response in mice. *J Invest Dermatol* 117: 1621-6.
- Andoh T, Kuraishi Y (2003). Nitric oxide enhances substance P-induced itch-associated responses in mice. *Br J Pharmacol* 138: 202-208.
- Andoh T, Kuraishi Y (2006). Suppression by bepotastine besilate of substance P-induced itch-associated responses through the inhibition of the leukotriene B4 action in mice. *Eur J Pharmacol* 547: 59-64.
- Andrew D, Craig AD (2001). Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci* 4:72-77.
- Andrew D, Schmelz M, Ballantyne JC (2003). Itch – mechanisms and mediators. In: Dostrovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, eds. *Progress in pain research and management*. Seattle: IASP Press, 2003: 213-226.
- Arai I, Takano N, Hashimoto Y, Futaki N, Sugimoto M, Takahashi N, Inoue T, Nakaike S (2004). Prostanoid DP1 receptor agonist inhibits the pruritic activity in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol* 505: 229-35.
- Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R (2007). Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 132: 26-37.
- Barry GD, Le GT, Fairlie DP (2006). Agonists and antagonists of protease activated receptors (PARs). *Curr Med Chem* 13: 243-265.
- Beirith A, Santos AR, Calixto JB (2003). The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Res* 969: 110-116.
- Bell JK, Mcqueen DS, Rees JL (2004). 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* 142: 374-380.

- Blunk JA, Schmelz M, Zeck S, Skov P, Likar R, Koppert W (2004). Opioid-induced mast cell activation and vascular responses is not mediated by mu-opioid receptors: an in vivo microdialysis study in human skin. *Anesth Analg* 98: 364-370.
- Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW (1996). Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* 15: 1009-1016.
- Bono F, Schaeffer P, Héroult JP, Michaux C, Nestor AL, Guillemot JC, Herbert JM (2000). Factor Xa activates endothelial cells by a receptor cascade between EPR-1 and PAR-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: E107-112.
- Boyce S, Rupniak N, Carlson EJ, Webb J, Borkowski JA, Hess F, Strader CD, Hill RG. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B 2 bradykinin receptor knockout mice. *Immunopharmacology* 33: 333-335.
- Brand M, Klusch A, Kurzai O, Valdeolmillos M, Schmidt RF, Petersen M (2001). No evidence for bradykinin B1 receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *NeuroReport* 12: 3165-3168.
- Bucci M, Roviezzo F, Cirino G (2005). Protease-activated receptor-2 (PAR2) in cardiovascular system. *Vascular Pharmacol* 43: 247-253.
- Bueno L, Fioramonti J (2008). Protease-activated receptor 2 and gut permeability: a review. *Neurogastroenterol Motil* 20: 580-7.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87: 1-5.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM (2001). Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Cur Op Anesthesiol* 14: 519-526.
- Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM (2004). Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 143: 803-818.
- Camerer E, Huang W, Coughlin SR (2000). Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5255-5260.
- Campos ROP, Alves RV, Ferreira J, Kyle DJ, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Calixto JB (1999). Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B2 receptor antagonist. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360 :278-286.
- Caterina MJ, Julius D (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24: 487-517.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitl KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288: 306-313.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
- Chambers LS, Black JL, Ge Q, Carlin SM, Au WW, Poniris M, Thompson J, Johnson PR, Burgess JK (2003). PAR-2 activation, PGE<sub>2</sub>, and COX-2 in human asthmatic and

- nonasthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L619-L627.
- Chapman V, Dickenson AH (1992). The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur J Pharmacol* 219: 427-33.
- Chen CL, Wang SD, Zeng ZY, Lin KJ, Kao ST, Tani T, Yu CK, Wang JY (2006). Serine protease inhibitors nafamostat mesilate and gabexate mesilate attenuate allergen-induced airway inflammation and eosinophilia in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 118: 105-112.
- Chichorro JG, Lorenzetti BB, Zampronio AR. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol* 141: 1175–1184.
- Cies JJ, Giamalis JN (2007). Treatment of cholestatic pruritus in children. *Am J Health Syst Pharm* 64:1157-62.
- Claudino RF, Kassuya CA, Ferreira J, Calixto JB (2006). Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 611-8.
- Correa CR, Kyle DJ, Chakraverty S, Calixto JB (1996). Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. *Br J Pharmacol* 117: 552-558.
- Corvera CU, Dery O, McConalogue K, Bohm SK, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, Bunnett NW (1997). Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 100: 1383-1393.
- Costa SKP, Starr A, Hyslop S, Gilmore D, Brain SD (2005). How important are NK1 receptors for influencing microvascular inflammation and itch in the skin? Studies using *Phoneutria nigriventer* venom. *Vasc Pharmacol* 45: 209-214.
- Cottrell G S, Amadesi S, Grady E F, Bunnett N W (2004). Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem*, 279: 13532-13539.
- Cottrell GS, Amadesi S, Schmidlin F, Bunnett N (2003). Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. *Biochem Soc Trans* 31: 1191-1197.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429: 161–176.
- Cuellar JM, Jinks SL, Simons CT, Carstens E (2003). Deletion of the preprotachykinin A gene in mice does not reduce scratching behavior elicited by intradermal serotonin. *Neurosci Lett* 339: 72-76.
- D'Andrea MR, Rogahn CJ, Andrade-Gordon P (2000). Localization of protease-activated receptors-1 and -2 in human mast cells: indications for an amplified mast cell degranulation cascade. *Biotech Histochem* 75:85–90.
- Darsow U, Drzezga A, Frisch M, Munz F, Weilke F, Bartenstein P, Schwaiger M, Ring J (2000). Processing of histamine-induced itch in the human cerebral cortex: a correlation analysis with dermal reactions. *J Invest Dermatol* 115: 1029-1033.
- Davidson S, Zhang X, Yoon CH, Khasabov SG, Simone DA, Giesler GJ Jr (2007). The itch-producing agents histamine and cowhage activate separate populations of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurosci* 27: 10007-10014.

- Davies MG, Greaves MW (1980). Sensory responses of human skin to synthetic histamine analogues and histamine. *Br J Clin Pharmacol* 9:461-465.
- Davis CJ, Naeem S, Phagoo SB, Campbell EA, Urban L, Burgess GM (1996). B1 bradykinin receptors and sensory neurones. *Br J Pharmacol* 118: 1469–1476.
- Dawn AG, Yosipovitch G (2006). Butorphanol for treatment of intractable pruritus. *J Am Acad Dermatol* 54: 527-531.
- Dendorfer A, Wolfrum S, Dominiak P (1999). Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. *Jpn J Pharmacol* 79: 403-426.
- Drzezga A, Darsow U, Treede RD, Siebner H, Frisch M, Munz F, Weilke F, Ring J, Schwaiger M, Bartenstein P (2001). Central activation by histamine-induced itch: analogies to pain processing: a correlational analysis of O-15 H<sub>2</sub>O positron emission tomography studies. *Pain* 92:295-305.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LBA, Lipsky PE (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073.
- Dunford PJ, Williams KN, Desai PJ, Karlsson L, Mcqueen D, Thurmond RL (2007). Histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy Clin Immunol* 119, 176-183.
- Ferreira J, Campos MM, Araújo R, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB (2002). The use of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology* 43: 1188-1197.
- Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, Calixto JB (2001). Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41: 1006-1012.
- Ferreira J, Da Silva GL, Calixto JB (2004). Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B<sub>2</sub> kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 141: 787-794.
- Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, Cabrini DA, Mori MA, Pesquero JB, Bader M, Calixto JB (2008). The role of kinin B<sub>1</sub> receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. *Neuropharmacology* 54: 597-604.
- Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, Calixto JB (2005). Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 117: 171-81.
- Fox A, Wotherspoon G, Mcnair K, Hudson L, Patel S, Gentry C, Winter J (2003). Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B<sub>1</sub> bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain* 104: 683–691.
- Fujii M, Tomozawa J, Mizutani N, Nabe T, Danno K, Kohno S (2005). Atopic dermatitis-like pruritic skin inflammation caused by feeding a special diet to HR-1 hairless mice. *Exp Dermatol* 14: 460–468.
- Gamse R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. *Naunyn-Schmiedeberg`s Arch Pharmacol* 320: 205-216.
- Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrie P, Finance O, Le Fur G (2004). SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[6-



- methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl)amino]-3-(4-[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 661-669.
- Griesbacher T, Amann R, Sametz W, Diethart S, Juan H. The nonpeptide B2 receptor antagonist FR173657: inhibition of effects of bradykinin related to its role in nociception. *Br J Pharmacol* 124, 1328-1334.
- Hägermark O (1973). Influence of antihistamines, sedatives, and aspirin on experimental itch. *Acta Derm Venereol* 53: 363-368.
- Hägermark O (1974). Studies on experimental itch induced by kallikrein and bradykinin. *Acta Derm Venereol*. 54: 397-400.
- Hägermark O, Rajka G, Bergvist U (1972). Experimental itch in human skin elicited by rat mast cell chymase. *Acta Derm Venereol*. 52: 125-8.
- Hägermark O, Strandberg K, Gronneberg R (1979). Effects of histamine receptor antagonists on histamine-induced responses in human skin. *Acta Derm Venereol* 59: 297-300.
- Han SK, Mancino V, Simon MI (2006). Phospholipase Cbeta 3 mediates the scratching response activated by the histamine H<sub>1</sub> receptor on C-fiber nociceptive neurons. *Neuron* 52:691-703.
- Harada C, Fujii Y, Hirai T, Shinomiya K, Kamei C (2004). Inhibitory effect of iodophenpropit, a selective histamine H<sub>3</sub> antagonist, on amygdaloid kindled seizures. *Brain Res Bull* 63: 143-146.
- Hashiro M, Okumura M (1997). Anxiety, depression and psychosomatic symptoms in patients with atopic dermatitis: comparison with normal controls and among groups of different degrees of severity. *J Dermatol Sci* 14:63-67.
- Hayashi I, Majima M (1999). Reduction of sodium deoxycholic acid-induced scratching behaviour by bradykinin B2 receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 126: 197-204.
- Herman SM, Vender RB (2003). Antihistamines in the treatment of dermatitis. *J Cutan Med Surg* 7:467-73.
- Hess JF (1997). Molecular pharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S.G. (Ed), *The kinin system*, London: Academic Press, p. 45-55.
- Heyer G, Dotzer M, Diepgen TL, Handwerker HO. Opiate and H<sub>1</sub> antagonist effects on histamine induced pruritus and allodynia. *Pain* 73: 239-243.
- Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. Orexin 1 receptor activation attenuates neurogenic dural vasodilation in an animal model of trigeminovascular nociception. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1380-1385.
- Holzer P (1998). Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol* 30: 5-11.
- Hoogerwerf WA, Zou L, Shenoy M, Sun D, Micci MA, Lee-Hellmich H, Xiao SY, Winston JH, Pasricha PJ (2001). The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. *J Neurosci* 21: 9036-9042.

- Hosogi M, Schmelz M, Miyachi Y, Ikoma A (2006). Bradykinin is a potent pruritogen in atopic dermatitis: a switch from pain to itch. *Pain* 126: 16-23.
- Hossen MA, Inoue T, Shinmei Y, Fujii Y, Watanabe T, Kamei C (2006). Role of substance P on histamine H<sub>3</sub> antagonist-induced scratching behavior in mice. *J Pharmacol Sci* 100: 297-302.
- Hossen MA, Sugimoto Y, Kayasuga R, Kamei C (2003). Involvement of histamine H<sub>3</sub> receptors in scratching behaviour in mast cell-deficient mice. *Br J Dermatol* 149: 17-22.
- Hylden JL, Wilcox GL (1980). Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67: 313-6.
- Ikoma A, Steinhoff M, Stander S, Yosipovitch G, Schmelz M (2006). The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci* 7: 535-547.
- Ikoma, A., Handwerker, H., Miyachi, Y. & Schmelz, M (2005). Electrically evoked itch in humans. *Pain* 113: 148-154.
- Imamura T, Potempa J, Travis J (2004). Activation of the kallikrein-kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cell proteinases. *Biol Chem* 385, 989-996.
- Inagaki N, Igeta K, Kim JF, Nagao M, Shiraishi N, Nakamura N, Nagai H (2002). Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 448:175-83.
- Inagaki N, Shiraishi N, Igeta K, Itoh T, Chikumoto T, Nagao M, Kim JF, Nagai H (2006). Inhibition of scratching behavior associated with allergic dermatitis in mice by tacrolimus, but not by dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 546: 189-96.
- Inoue H, Nagata N, Koshihara Y (1996). Effect of the tachykinin receptor antagonists, SR140333, FK888, and SR142801, on capsaicin-induced mouse ear oedema. *Inflamm Res* 45: 303-307.
- Inoue T, Sugimoto M, Sakurai T, Saito R, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Arai I, Nakaike S (2007). Modulation of scratching behavior by silencing an endogenous cyclooxygenase-1 gene in the skin through the administration of siRNA. *J Gene Med* 9: 994-1001.
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, 3: 502-506.
- Johanek LM, Meyer RA, Friedman RM, Greenquist KW, Shim B, Borzan J, Hartke T, LaMotte RH, Ringkamp M (2008). A role for polymodal C-fiber afferents in nonhistaminergic itch. *J Neurosci* 28:7659-7669.
- Johanek LM, Meyer RA, Hartke T, Hobelmann JG, Maine DN, LaMotte RH, Ringkamp M (2007). Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch. *J Neurosci* 27:7490-7497.
- Jones EA (2002). Trials of opiate antagonists for the pruritus of cholestasis: primary efficacy endpoints and opioid withdrawal-like reactions. *J Hepatol* 37:863-865.
- Julius D, Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210.

- Kamei J, Nagase H (2001). Norbinaltorphimine, a selective k-opioid receptor antagonist, induces an itch-associated response in mice. *Eur J Pharmacol* 418: 141-145.
- Kanda N, Koike S, Watanabe S (2005). Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances neurotrophin-4 production via Ep3 receptor in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 796-804.
- Kawabata A, Kawao N (2005). Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PARs in the respiratory system: cellular signaling and physiological/pathological roles. *Pharmacol Sci* 97: 20-24
- Kawabata A, Kawao N, Kitano T, Matsunami M, Satoh R, Ishiki T, Masuko T, Kanke T, Saito N (2006). Colonic hyperalgesia triggered by proteinase-activated receptor-2 in mice: involvement of endogenous bradykinin. *Neurosci Lett* 402: 167-172.
- Kawabata A, Kawao N, Kuroda R, Itoh H, Nishikawa H (2002). Specific expression of spinal Fos after PAR-2 stimulation in mast cell-depleted rats. *Neuroreport* 13: 511-514.
- Kawabata A, Kawao N, Kuroda R, Tanaka A, Itoh H, Nishikawa H (2001a). Peripheral PAR-2 triggers thermal hyperalgesia and nociceptive responses in rats. *Neuroreport* 12: 715-719.
- Kawabata A, Kinoshita M, Nishikawa H, Kuroda R, Nishida M, Araki H, Arizono N, Oda Y, Kakehi K (2001b). The protease-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J Clin Invest* 107: 1443-50.
- Kawao N, Shimada C, Itoh H, Kuroda R, Kawabata A (2002). Capsazepine inhibits thermal hyperalgesia but not nociception triggered by protease-activated receptor-2 in rats. *Jpn J Pharmacol* 89:184-187.
- Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, Gingrich JA, Hamon M, Bourgoin S (2007). Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT<sub>1A</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>1B</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>3A</sub><sup>-/-</sup> and 5-HTT<sup>-/-</sup> knock-out male mice. *Pain* 130:235-48.
- Kim DK, Kim HJ, Kim H, Koh JY, Kim KM, Noh MS, Kim JJ, Lee CH (2008). Involvement of serotonin receptors 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> in 12(S)-HPETE-induced scratching in mice. *Eur J Pharmacol* 579: 390-394.
- Kim DK, Kim HJ, Sung KS, Kim H, Cho SA, Kim KM, Lee CH, Kim JJ. 12(S)-HPETE induces itch-associated scratchings in mice. *Eur J Pharmacol* 554: 30-33.
- Klede M, Handwerker HO, Schmelz M (2003). Central origin of secondary mechanical hyperalgesia. *J Neurophysiol* 90: 353-359.
- Klein PA, Clark RA (1999). An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 135:1522-5.
- Ko MC, Lee H, Song MS, Sobczyk-Kojiro K, Mosberg HI, Kishioka S, Woods JH, Naughton NN. Activation of kappa-opioid receptors inhibits pruritus evoked by subcutaneous or intrathecal administration of morphine in monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 173-179.
- Ko MCH, Song MS, Edwards T, Lee H, Naughton NN (2004). The role of central opioid receptors in opioid-Induced Itch in primates. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 169-176.

- Koetzner L, Gregory JA, Yaksh TL (2004). Intrathecal protease-activated receptor stimulation produces thermal hyperalgesia through spinal cyclooxygenase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 356-363.
- Kong W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Bohm SK & Bunnett NW (1997). Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8884-8889.
- Koppert W, Reeh PW, Handwerker HO (1993). Conditioning of histamine by bradykinin alters responses of rat nociceptor and human itch sensation. *Neurosci Lett* 152: 117-120.
- Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M (1995). Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol*. 275: 229-33.
- Laursen SE, Belknap JK (1986). Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. *J Pharmacol Methods* 16: 355-357.
- Liao JK, Homcy CJ (1993). The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. *J Clin Invest* 92:2168-2172.
- Liebmann C (2001). Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol Chem* 382: 49-55.
- Liebmann C, Böhmer FD (2000). Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signalling. *Curr Med Chem* 7: 911-943.
- Ma QP, Heavens R (2001). Basal expression of bradykinin B(1) receptor in the spinal cord in humans and rats. *NeuroReport* 12: 2311-2314.
- Ma, QP (2001). The expression of bradykinin B1 receptors on primary sensory neurones that give rise to small calibre sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience* 107: 665-673.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53: 245-282.
- Marceau F, Hess Jf, Bachvarov DR (1998). The B<sub>1</sub> receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50:357-386.
- Marceau F, Regoli D (2004). Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 3: 845-52.
- Marotta DM, Costa R, Motta EM, Fernandes ES, Medeiros R, Quintão NLM, Campos MM, Calixto JB (2009). Mechanisms underlying the nociceptive responses induced by platelet-activating factor (PAF) in the rat paw. *Biochem Pharmacol (Aceito para Publicação)*.
- Mendes GL, Santos ARS, Malheiros A, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Calixto JB. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 164-172.
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA (1997). Mast cells. *Physiol Rev* 77:1033-1079.
- Mizumura K, Koda H (1999). Potentiation and suppression of the histamine response by raising and lowering the temperature in canine visceral polymodal receptors in vitro. *Neurosci Lett* 266: 9-12.

- Mochizuki H, Tashiro M, Kano M, Sakurada Y, Itoh M, Yanai K (2003). Imaging of central itch modulation in the human brain using positron emission tomography. *Pain* 105: 339-346.
- Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, Hoxie JA, Schechter N, Woolkalis M, Brass LF (1997). Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 272: 4043-4049.
- Murphy M, Reaich D, Pai P, Carmichael AJ (2003). A randomized, placebo controlled, double-blind trial of ondansetron in renal itch, *Br J Dermatol* 148: 314-317.
- Nakano T, Andoh T, Lee JB, Kuraishi Y (2008). Different dorsal horn neurons responding to histamine and allergic itch stimuli. *Neuroreport* 19: 723-726.
- Namer B, Carr R, Johanek LM, Schmelz M, Handwerker HO, Ringkamp M (2008). Separate peripheral pathways for pruritus in man. *J Neurophysiol* 100: 2062-2069.
- Neisius U, Olsson R, Rukwied R, Lischetzki G, Schmelz M (2002). Prostaglandin E<sub>2</sub> induces vasodilation and pruritus, but no protein extravasation in atopic dermatitis and controls. *J Am Acad Dermatol* 47: 28-32.
- Nilsson HJ, Levinsson A, Schouenborg J (1997). Cutaneous field stimulation (CFS): a new powerful method to combat itch. *Pain* 71: 49-55.
- Nojima H, Carstens E (2003). 5-Hydroxytryptamine (5-HT)<sub>2</sub> Receptor involvement in acute 5-HT-evoked scratching but not in allergic pruritus induced by dinitrofluorobenzene in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 245-252.
- Obreja O, Rukwied R, Steinhoff M, Schmelz M (2006). Neurogenic components of trypsin- and thrombin-induced inflammation in rat skin, in vivo. *Exp Dermatol* 15: 58-65.
- Oda T, Morikawa N, Saito Y, Musulho Y, Matsumoto S (2000). Molecular cloning and characterization of novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 275: 36781-36786.
- Ohmura T, Tsunenari I, Hayashi T, Satoh Y, Konomi A, Nanri H, Kawachi M, Morikawa M, Kadota T, Satoh H (2004). Role of substance P in an NC/Nga mouse model of atopic dermatitis-like disease. *Int Arch Allergy Immunol* 133: 389-97.
- Ongali B, Campos MM, Bregola G, Rodi D, Regoli D, Thibault G, Simonato M, Couture, R. (2003). Autoradiographic analysis of rat brain kinin B1 and B2 receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. *J Comp Neurol* 461: 506-519.
- Ossovskaya VS, Bunnett NW (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Ver*, 84: 579-621.
- Ostlere LS, Cowen T, Rustin MH (1995). Neuropeptides in the skin of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 20:462-7.
- Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH (2001). The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*. 102: 937:944.
- Parsons ME, Ganellin CR (2006). Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S127-35.
- Paszczuk AF (2007). Mecanismos envolvidos nas respostas nociceptivas e inflamatórias induzidas pela tripsina na pata de camundongos. 109 f. Dissertação

(mestrado em farmacologia) – curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

- Paszczuk AF, Quintão NLM, Fernandes ES, Juliano L, Chapman K, Andrade-Gordon P, Campos MM, Vergnolle N, Calixto JB (2008). Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory responses induced by trypsin in the mouse paw. *Eur J Pharmacol*. 581: 204-215.
- Paus R, Schmelz M, Biro T, Steinhoff M (2006). Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. *J Clin Invest* 116: 1174-1186.
- Perkins MN, Kelly D (1994). Interleukin-1b induced-desArg<sup>9</sup>-bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* 33, 657–660.
- Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M (2000). Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 8140-8145.
- Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, Paus R, Scholzen TE (2006). Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol* 126: 1937-1947.
- Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Frighetto M, Souza GE, Henriques MG, Rae GA (2004). Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitized mice. *Br J Pharmacol* 141: 755-763.
- Prediger RD, Medeiros R, Pandolfo P, Duarte FS, Passos GF, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB, Takahashi RN (2008). Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 151: 631-643.
- Proud D, Kaplan AP (1988). Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol* 6: 49-83.
- Quintão NL, Passos GF, Medeiros R, Paszczuk AF, Motta FL, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB (2008). Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* 28: 2856-2863.
- Rajakulasingam K, Polosa R, Holgate ST, Howarth PH (1991). Comparative nasal effects of bradykinin, kallidin and [Des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin in atopic rhinitic and normal volunteers. *J Physiol* 437: 577-587.
- Rajakulasingam K, Polosa R, Lau LC, Church MK, Holgate ST, Howarth PH (1993). Comparative nasal effects of bradykinin and histamine: influence on nasal airways resistance and plasma protein exudation. *Thorax* 48: 324-9.
- Ramachandran R, Hollenberg MD (2007). Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* 153: S263-282.
- Reddy VB, Iuga AO, Shimada SG, LaMotte RH, Lerner EA (2008). Cowhage-evoked itch is mediated by a novel cysteine protease: a ligand of protease-activated receptors. *J Neurosci* 28: 4331-4335.
- Regoli D, Barabé J, Park WK (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol*, 55:855-867.

- Remröd C, Lonne-Rahm S, Nordlind K (2007). Study of substance P and its receptor neurokinin-1 in psoriasis and their relation to chronic stress and pruritus. *Arch Dermatol Res* 299:85-91.
- Richardson JD, Vasko MR (2006). Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 839-845.
- Rosbach K, Wendorff S, Sander K, Stark H, Gutzmer R, Werfel T, Kietzmann M, Bäumer W (2008). Histamine H(4) receptor antagonism reduces hapten-induced scratching behaviour but not inflammation. *Exp Dermatol*. [publicação on line: 17 de Jul].
- Rukwied R, Lischetzki G, McGlone F, Heyer G, Schmelz M (2000). Mast cell mediators other than histamine induce pruritus in atopic dermatitis patients: a dermal microdialysis study. *Br J Dermatol* 142:1114-20.
- Rupniak NM, Boyce S, Webb JK, Williams AR, Carlson EJ, Hill RG, Borkowski JA, Hess JF. Effects of the bradykinin B<sub>1</sub> receptor antagonist des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]bradykinin and genetic disruption of the B<sub>2</sub> receptor on nociception in rats and mice. *Pain* 71: 89-97.
- Samoszuk M, Corwin MA (2003). Mast cell inhibitor cromolyn increases blood clotting and hypoxia in murine breast cancer. *Int J Cancer* 107: 159-163.
- Sándor K, Helyes Z, Gyires K, Szolcsányi J, László J (2007). Static magnetic field-induced anti-nociceptive effect and the involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in this mechanism. *Life Sci* 81: 97-102.
- Schanstra JP, Arlic C, Marin-Castano MB, Girolami J, Bascands J (1999). Renal bradykinin receptors: localisation, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role. *Int J Mol Med* 3:185-191.
- Schmelz M (2001). A neural pathway for itch. *Nat Neurosci* 4: 9-10.
- Schmelz M (2005). Itch and pain. *Dermatol Ther*. 18: 304-307.
- Schmelz M, Hilliges M, Schmidt R, Orstavik K, Vahlquist C, Weidner C, Handwerker HO, Torebjörk HE (2003b). Active "itch fibers" in chronic pruritus. *Neurology* 61: 564-566.
- Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE (1997). Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci* 17: 8003-8008.
- Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjörk HE, Handwerker HO (2003a). Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J Neurophysiol* 89:2441-248.
- Schmelz M; Handwerker HO (2005). Itch. In: McMahon S, Koltzenburg M, eds. *Wall and Melzack's textbook of pain*. USA: Elsevier, 2005: 219-227.
- Schmidlin F, Bunnett NW (2001). Protease-activated receptors: how proteases signal to cells. *Curr Opin Pharmacol* 1: 575-582.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15: 333-341.
- Seabrook GR, Bowery BJ, Heavens R, Brown N, Ford H, Sirinathsinghji DJS, Borkowski JA, Hess JF, Strader CD, Hill RG (1997). Expression of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> bradykinin receptor mRNA and their function roles in sympathetic ganglia and sensory root ganglia

- neurones from wild-type and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 36: 1009–1017.
- Seeliger S, Derian CK, Vergnolle N, Bunnett NW, Nawroth R, Schmelz M, Von Der Weid PY, Buddenkotte J, Sunderkotter C, Metz D, Andrade-Gordon P, Harms E, Vestweber D, Luger TA, Steinhoff M (2003). Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. *FASEB J* 17: 1871-1885.
- Sheehan-Dare RA, Henderson MJ, Cotterill JA (1990). Anxiety and depression in patients with chronic urticaria and generalized pruritus. *Br J Dermatol* 123: 769-774.
- Shelley WB, Arthur RP (1955). Mucunain, the active pruritogenic proteinase of cowhage. *Science* 122: 469-4760.
- Shim WS, Tak MH, Lee MH, Kim M, Kim M, Koo JY, Lee CH, Kim M, Oh U (2007). TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A<sub>2</sub> and 12-lipoxygenase. *J Neurosci* 27: 2331-2337.
- Shimada SG, Shimada KA, Collins JG (2006). Scratching behavior in mice induced by the proteinase-activated receptor-2 agonist, SLIGRL-NH<sub>2</sub>. *Eur J Pharmacol* 530: 281-283.
- Shughrue PJ, Ky B, Austin CP (2003). Localization of B1 bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 465: 372–384.
- Siqueira-Junior JM, Peters RR, Brum-Fernandes AJ, Ribeiro-Do-Valle RM (2003). Effects of valeryl salicylate, a COX-1 inhibitor, on models of acute inflammation in mice. *Pharmacol Res* 48: 437-443.
- Ständer S, Luger T, Metz D (2001). Treatment of prurigo nodularis with topical capsaicin. *J Am Acad Dermatol* 44: 471–478.
- Ständer S, Schürmeyer-Horst F, Luger TA, Weisshaar E (2006). Treatment of pruritic diseases with topical calcineurin inhibitors. *Ther Clin Risk Manag* 2: 213-218.
- Ständer S, Steinhoff M, Schmelz M, Weisshaar E, Metz D, Luger T (2003). Neurophysiology of pruritus. *Arch Dermatol* 139: 1463-1470.
- Stefansson K, Brattsand M, Roosterman D, Kempkes C, Bocheva G, Steinhoff M, Egelrud T (2006). Activation of Proteinase-Activated Receptor-2 by Human Kallikrein-Related Peptidases. *J Invest Dermatol* 128: 1825.
- Steinhoff M, Bienenstock J, Schmelz M, Maurer M, Wei E, Biro T (2006). Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. *J Invest Dermatol* 126: 1705-1718.
- Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD (2005). Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26: 1-43.
- Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW (1999). Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 8: 282-294.



- Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Skov PS, Luger TA, Schmelz M (2003). Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci* 23: 6176-6180.
- Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6: 151-8.
- Su X, Camerer E, Hamilton JR, Coughlin SR, Matthay MA (2005). Protease-activated receptor-2 activation induces acute lung inflammation by neuropeptide-dependent mechanisms. *J Immunol* 175:2598-605.
- Sufka KJ, Roach JT (1996). Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B1 and B2 receptor antagonists in rats. *Pain*, 66: 99-103.
- Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S (2005). Increased scratching counts depend on a decrease in ability of cutaneous prostaglandin D<sub>2</sub> biosynthesis in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 14: 898-905.
- Sugimoto M, Arai I, Futaki N, Hashimoto Y, Honma Y, Nakaike S (2006). COX-1 inhibition enhances scratching behaviour in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 15: 582-588.
- Sugimoto Y, Iba Y, Nakamura Y, Kayasuga R, Kamei C (2004). Pruritus-associated response mediated by cutaneous histamine H3 receptors. *Clin Exp Allergy* 34: 456-459.
- Sugimoto Y, Umakoshi K, Nojiri N, Kamei C (1998). Effects of histamine H1 receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. *Eur J Pharmacol*. 351:1-5.
- Sun YG, Chen ZF (2007). A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature* 448: 700-703.
- Syeda F, Grosjean J, Houliston RA, Keogh RJ, Carter TD, Paleolog E, Wheeler-Jones CP (2006). Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *J Biol Chem*, 281: 11792-11804.
- Takano N, Arai I, Hashimoto Y, Kurachi M (2004). Evaluation of antipruritic effects of several agents on scratching behavior by NC/Nga mice. *Eur J Pharmacol* 495: 159-165.
- Takano N, Arai I, Kurachi M (2003). Analysis of the spontaneous scratching behavior by NC/Nga mice: a possible approach to evaluate antipruritics for subjects with atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol* 471: 223-228.
- Takaoka A, Arai I, Sugimoto M, Futaki N, Sakurai T, Honma Y, Nakaike S (2006). Role of scratch-induced cutaneous prostaglandin D<sub>2</sub> production on atopic-like scratching behaviour in mice. *Exp Dermatol* 16: 331-339.
- Takeeda M, Yamato M, Kato S, Takeuchi K (2003). Cyclooxygenase isozymes involved in adaptive junctional responses in rat stomach after barrier disruption. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 713-719.
- Terakawa M, Fujieda Y, Tomimori Y, Muto T, Tanaka T, Maruoka T, Nagahira K, Ogata A, Nakatsuka T, Fukuda Y (2008). Oral chymase inhibitor SUN13834 ameliorates

- skin inflammation as well as pruritus in mouse model for atopic dermatitis. *Eur J Pharmacol* 601: 186-191.
- Thomsen JS, Petersen MB, Benfeldt E, Jensen SB, Serup J (2001). Scratch induction in the rat by intradermal serotonin: a model for pruritus. *Acta Derm Venereol* 81: 250-254.
- Thomsen JS, Sonne M, Benfeldt E, Jensen SB, Serup J, Menne T (2002). Experimental itch in sodium lauryl sulphate-inflamed and normal skin in humans: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of histamine and other inducers of itch. *Br J Dermatol* 146: 792-800.
- Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ (2008). The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov* 7: 41-53.
- Togashi Y, Umeuchi H, Okano K, Ando N, Yoshizawa Y, Honda T, Kawamura K, Endoh T, Utsumi J, Kamei J, Tanaka T, Nagase H. Antipruritic activity of the k-opioid receptor agonist, TRK-820. *Eur J Pharmacol* 435: 259– 264.
- Toyoda M, Makino T, Kagoura M, *et al* (2000). Immunolocalization of substance P in human skin mast cells. *Arch Dermatol Res* 292:418-21.
- Trejo J (2003). Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 437-442.
- Trentin PG (2006). Endotelina induz comportamento de coçar quando administrada no dorso de camundongos. 64 f. Dissertação (mestrado em farmacologia) – curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- Tsuji K, Andoh T, Lee JB, Kuraishi Y (2008). Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and -independent pathways in mice. *J Pharmacol Sci* 108: 385-8.
- Ui H, Andoh T, Lee JB, Nojima H, Kuraishi Y (2006). 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* 530: 172-178.
- Umeuchi H, Togashi Y, Honda T, Nakao K, Okano K, Tanaka T, Nagase H (2003). Involvement of central mu-opioid system in the scratching behavior in mice, and the suppression of it by the activation of kappa-opioid system. *Eur J Pharmacol* 477: 29-35.
- Varga A, Németh J, Szabó A, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z (2005). Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Life Sci* 385: 137-142.
- Vergnolle N (1999). Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induced leukocytes rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol*, 163: 5064-5069.
- Vergnolle N (2005). Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1: 173-176.
- Vergnolle N, Bunnett NW, Sharley KA, Brussee V, Compton S, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum A, Andrade-Gordon, P, Hollenberg MD, Wallace JL (2001). Proteinase-activated receptor 2 and hyperalgesia: a novel pain pathway. *Nat Med* 7: 821-826.

- Vergnolle N, Ferazzini M, D'andrea MR, Buddenkotte J, Steinhoff M (2003). Proteinase-activated receptors: novel signals for peripheral nerves. *Trends Neurosci* 26: 496-500.
- Vergnolle N, Hollenberg MD, Sharkey KA, Wallace JL (1999). Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol* 127: 1083-1090.
- Veronesi B, Sailstad DM, Doerfler DL, Selgrade M (1995). Neuropeptide modulation of chemical induced skin irritation. *Toxicol Appl Pharmacol* 135: 258-267.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 22: 1057-1068.
- Wakasa Y, Fujiwara A, Umeuchi H, Endoh T, Okano K, Tanaka T, Nagase H. Inhibitory effects of TRK-820 on systemic skin scratching induced by morphine in rhesus monkeys. *Life Sci* 75: 2947-57.
- Ward L, Wright E, McMahon SB (1996). A comparison of the effects of noxious and innocuous counterstimuli on experimentally induced itch and pain. *Pain* 64:129-138.
- Wei JY, Tuckett RP (1991). Response of cat ventrolateral spinal axons to an itch-producing stimulus (cowhage). *Somatosens Mot Res* 8: 227-239.
- Weidner C, Schmelz M, Schmidt R, Hansson B, Handwerker HO, Torebjörk HE (1999). Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 19: 10184-10190.
- Weisshaar E, Dunker N, Domrose U, Neumann KH, Gollnick H. Plasma serotonin and histamine levels in hemodialysis-related pruritus are not significantly influenced by 5-HT<sub>3</sub> receptor blocker and antihistaminic therapy. *Clin Nephrol* 59: 124-129.
- Wikström B, Gellert R, Ladefoged SD, Danda Y, Akai M, Ide K, Ogasawara M, Kawashima Y, Ueno K, Mori A, Ueno Y (2005). Kappa-opioid system in uremic pruritus: multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *J Am Soc Nephrol* 16: 3742-7.
- Woodward DF, Nieves AL, Hawley SB, Joseph R, Merlino GF, Spada CS (1995). The pruritogenic and inflammatory effects of prostanoids in the conjunctiva. *J Ocul Pharmacol Ther* 11: 339-47.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC (1998). Cloning and characterization of human proteaseactivated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6642-6666.
- Yamaguchi T, Nagasawa T, Satoh M, Kuraishi Y (1999). Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT<sub>2</sub> receptors in mice. *Neurosci Res* 35:77-83.
- Yamaoka J, Di ZH, Sun W (2007). Changes in cutaneous sensory nerve fibers induced by skin-scratching in mice. *J Dermatol Sci* 46: 41-51.
- Yamaoka J, Kawana S (2007a). A transient unresponsive state of self-scratching behaviour is induced in mice by skin-scratching stimulation. *Exp Dermatol* 16: 737-745.

- Yamaoka J, Kawana S (2007b). Rapid changes in substance P signaling and neutral endopeptidase induced by skin-scratching stimulation in mice. *J Dermatol Sci* 48: 123-132.
- Yamashita H, Makino T, Mizukami H, Nose M (2007). Pharmacological characterization of a chronic pruritus model induced by multiple application of 2,4,6-trinitrochlorobenzene in NC mice. *Eur J Pharmacol* 563: 233-9.
- Yamashita H, Michibata Y, Mizukami H, *et al* (2005). Dermal mast cells play a central role in the incidence of scratching behavior in mice induced by multiple application of the hapten, 2,4,6-trinitrochlorobenzene. *Exp Dermatol* 2005; 14:438-44.
- Yong LC (1997). The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Exp Toxicol Pathol* 49:409-24.
- Yosipovitch G, Fast K, Bernhard JD (2005). Noxious heat and scratching decrease histamine-induced itch and skin blood flow. *J Invest Dermatol* 125:1268-1272.
- Zegarska B, Lelinska A, Tyrakowski T (2006). Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep* 58: 13-21.
- Zhao A, Shea-Donohue T (2003). PAR-2 agonists induce contraction of murine small intestine through neurokinin receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G696-703.

## ***ANEXOS***

Uma parte dos resultados da presente dissertação está publicada em:

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

Parte dos demais resultados integram um trabalho, que está em fase de redação, a ser submetido à publicação:

Costa R et al. (2009). Involvement of both kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in the scratching behaviour induced by proteinase activated receptor-2 (PAR-2) agonists in mice. *Br J Pharmacol*.

Além deste trabalho, durante o curso de Mestrado foram desenvolvidos outros estudos que resultaram no aceite para publicação do seguinte trabalho:

Marotta DM, Costa R, Motta EM, Fernandes ES, Medeiros R, Quintão NLM, Campos MM, Calixto JB (2009). Mechanisms underlying the nociceptive responses induced by platelet-activating factor (PAF) in the rat paw. *Biochem Pharmacol* (Aceito para publicação).