LEANDRO RODRIGUES

EFEITOS ANTIPRURIGINOSOS DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (EXÓGENO E ENDÓGENO) SOBRE O PRURIDO AGUDO E CRÔNICO EM PELE DE CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

LEANDRO RODRIGUES

EFEITOS ANTIPRURIGINOSOS DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (EXÓGENO E ENDÓGENO) SOBRE O PRURIDO AGUDO E CRÔNICO EM PELE DE CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

Versão Original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rodrigues, Leandro
Efeitos antipruriginosos de hidrogênio (endógeno e exógeno) sobre o prurido agudo e crônico em pelle de camundongos / Leandro Rodrigues; orientadora Soraia Costa. -- São Paulo, 2017.
126 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Prurido. 2. Sulfeto de Hidrogênio. 3. Inflamação Cutânea. 4. Psoríase. 5. Atividade anti-oxidante. I. Costa, Soraia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leandro Rodrigues

Título da Tese: Efeitos antipruriginosos do sulfeto de hidrogênio (exógeno e endógeno) sobre o prurido agudo e crônico em pele de camundongos

Orientador(a): Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.098/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 100/2013/CEUA, datado de 24/09/2013, e por solicitação da Profa. Dra. **Soraia Katia Pereira Costa**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Leandro Rodrigues** ao Projeto de Pesquisa "*Avaliação farmacológica de composto doadores de sulfeto de hidrogênio (clássicos e de liberação lenta) no prurido em pele de camundongos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 25 de novembro de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador da CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho

Ao meu Senhor Jesus Cristo, por estar comigo nos momentos difícies, por ter fornecido paz na ansiedade e por ter mostrado um caminho de benções que permitiu chegar até este momento.

Aos meus amados pais Laudelino Rodrigues e Maria E. C. Rodrigues, pelos ensinamentos, pela educação, pelo amor e carinho, por toda dedicação para minha formação e por todo apoio incondicional.

A minha amada esposa Kelli Cardoso Lopes Rodrigues, por seu amor, por sua parceria, por sua paciência e dedicação, por ser minha companheira em todos os sentidos.

Aos meus queridos irmãos Rodrigues, Cibele, Anderson, Simone, Silvana, Débora e Jaqueline. Obrigado por estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profª Drª. Soraia Kátia Pereira Costa pela orientação neste estudo, por fornecer toda liberdade na realização dos experimentos, pelas discussões científicas, pela amizade e companherismo, por ter aberto as portas do laboratório de forma irrestrita desde o início. Tudo isso, fez com que este local fosse considerado minha segunda casa. Muito Obrigado!

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará pela coorientação, pelos conselhos, pelas conversas, pelo companherismo e apoio incondicional. Muito Obrigado.

Agradeço a Profª Drª. Carolina Demarchi Munhoz, ao Dr. Nilton Barreto dos Santos e ao Me. Leonardo Santana Novaes pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos deste estudo.

Agradeço aos amigos Me.Tuanny P. Schmidt e Anderson Cerqueira, pela fundamental ajuda na elaboração e execução dos experimentos, por todas as discussões e sugestões de hipóteses que axiliaram no aprimoramento dos resultados obtidos.

Agradeço a Drª. Simone Aparecida Teixeira e ao Me. Antonio Garcia Soares pela amizade e companherismo, pelo auxilio incondicional na realização dos experimentos.

Agradeço a Drª. Juliana Florenzano Martorelli e a Drª. Karen Tiago dos Santos, por toda ajuda com os experimentos e pelos bons momentos no laboratório.

Também agradeço aos amigos que participaram diretamente na realização deste estudo, Me. Silvia A. Coavoy-Sánchez, Gabriel Gomes, Charliston Alves Cunha e Me. Karla Feitosa, muito obrigado.

Agradeço aos amigos do laboratório, Me Flávia Neto de Jesus, Mayrine Fonseca e Carolina Lourenço Marques pelo apoio.

Agradeço aos membros da Igreja Evangélica da Paz, aos Pr. Joel Arcanjo e Pra. Sandra Zaleschi Arcanjo. Muito obrigado pelo apoio e orações.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos na modalidade doutorado, fundamental para o desenvolvimento deste estudo.
Processo: 163278/2012-1

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos fornecidos, fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.
Processo: 13/04151-3

Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam.
1 Coríntios 2:9

Resumo

Rodrigues L. [Efeitos antipruriginosos do sulfeto de hidrogênio (exógeno e endógeno) sobre o prurido agudo e crônico em pele de camundongos]. [Tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017

O prurido, assim como a dor, é uma experiência sensorial aversiva, associada ao desejo de coçar-se. Resultados prévios deste grupo demonstraram que a injeção i.d. de moléculas doadoras do sulfeto de hidrogênio (H_2S), um novo mediador endógeno, reduziu o prurido agudo e a inflamação cutânea induzidos por histamina ou composto 48/80 (C48/80) na pele dorsal de camundongos, sugerindo o envolvimento do H_2S no controle do prurido mediado por aminas. Todavia, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na indução ou inibição dessa percepção sensorial (aguda ou crônica), e a participação do H_2S. A fim de aprofundar esse conhecimento, os objetivos deste estudo foram: *i*) testar e caracterizar os mecanismos envolvidos nos efeitos protetores de diferentes moléculas doadoras de H_2S (liberação rápida e lenta) sobre o prurido agudo e inflamação associada, induzidos por estímulos dependente e independente de histamina, *ii*) averiguar a capacidade de produção endógena de H_2S e as enzimas envolvidas em sua síntese na pele murina saudável e doente, *iii*) padronizar um modelo de prurido crônico associado ao escore de intensidade da área inflamada na psoríase (PASI), e investigar o efeito protetor de um doador de H_2S de liberação lenta (GYY4137). Utilizando camundongos Balb/C, foi realizada a avaliação do comportamento de prurido agudo e inflamação cutânea (extravasamento plasmático, influxo de neutrófilos), frente a diversos estímulos, na ausência e vigência do co-tratamento (i.d.) com doadores de H_2S. A psoríase experimental foi induzida pela aplicação tópica do creme imiquimode (IMQ 5%) na pele dorsal destes, por 5 dias consecutivos, e grupos paralelos com a doença foram tratados pela via intraperitoneal (i.p.) com o GYY4137 em diferentes doses (25-100 mg/kg). Os registros do prurido e PASI foram obtidos durante a indução da psoríase e as análises bioquímicas e moleculares foram realizadas ao término do experimento. O tratamento com doses crescentes de GYY4137 (0,3 – 30 nmol/sitio, i.d.) inibiu o prurido agudo induzido por histamina ou cloroquina e reduziu o influxo de neutrófilos frente ao C48/80, mas não afetou o extravasamento plasmático induzido por histamina ou C48/80. O bloqueio das enzimas geradoras de H_2S maximizou o prurido e o influxo de neutrófilos desencadeado por C48/80. O pré-tratamento com a glibenclamida (10 mg/kg; i.p, -30 min), bloqueador dos canais de K_{ATP}, não reverteu o efeito do doador de H_2S de liberação rápida sobre o prurido agudo e inflamação induzidos por histamina. Em animais com psoríase, o tratamento (i.p.) com o GYY4137 reduziu ($P<0,05$) a inflamação cutânea (escores PASI) e o prurido, assim como inibiu o eixo NF-κB-caspase-1-IL-1β, e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, GST, GR e GPx). A pele de animais com psoríase exibiu menor capacidade na síntese de H_2S, que foi paralela à menor expressão da enzima Cistationina-β-sintetase (CBS). O bloqueador da enzima Cistationina-γ-liase (CSE) não interferiu no escore PASI ou prurido. Conclui-se que moléculas doadoras de H_2S representam novos alvos terapêuticos no controle da inflamação aguda ou imunomediada associada à percepção de prurido agudo ou crônico. No microambiente inflamatório agudo, o mecanismo envolvido é independente da ativação de canais de K_{ATP}, enquanto no crônico (psoríase) é dependente, em parte, da inibição da ativação do eixo NF-κB- caspase-1-IL-1β e aumento das defesas antioxidantes.

Palavras chaves: Sulfeto de hidrogênio. Prurido. Inflamação cutânea. Psoríase. Histamina. GYY4137. Atividade antioxidante. Camundongos.

Abstract

Rodrigues L. [Antipruritic effects of hydrogen sulfide (exogenous and endogenous) on acute and chronic pruritus in the mice skin]. [Ph. D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017

Pruritus, like pain, is an aversive sensory experience associated with the scratching desire. Previous findings from this group demonstrated that hydrogen sulphide (H_2S) donor molecules, a new endogenous mediator, when intra-dermal injected, reduced acute histamine and cutaneous inflammation induced by histamine or compound 48/80 (C48/80) on the dorsal skin of mice, suggesting the involvement of H_2S in the control of amine-mediated pruritus. However, little is known about the mechanisms involved in the induction or inhibition of this sensorial perception (acute or chronic) and the participation of H_2S. In order to get a better understanding, the objectives of this study were: i) to test and characterize the mechanisms involved in the protective effects of different H_2S donors molecules (fast and slow release) on acute pruritus and associated inflammation induced by histamine dependent and independent stimuli; ii) to investigate the endogenous production of H_2S and the enzymes involved in its synthesis in healthy and unhealthy/disease murine skin; and iii) to standardize a model of chronic pruritus associated with the psoriasis area severity index (PASI) in the inflamed skin, and to investigate the protective effect of a slow release H_2S donor (GYY4137). The behaviour evaluation of acute pruritus and cutaneous inflammation (plasma extravasation, neutrophil influx) was performed alongside with different stimuli with or without the co-treatment (i.d.) with H_2S donors in Balb/C mice. Experimental psoriasis was induced by topical application of imiquimod cream (IMQ 5%) on the dorsal skin, for 5 consecutive days, and at the same time, groups with the disease were treated intraperitoneally (i.p.) with GYY4137 at different doses (25 – 100 mg/kg). Records of pruritus and PASI were obtained during psoriasis induction, and biochemical and molecular analyses were performed at the end of the experiment. Firstly, treatment with increasing doses of GYY4137 (0.3 – 30 nmol/site, i.d.) inhibited acute pruritus induced by histamine or chloroquine and reduced the neutrophils influx induced by C48/80, without affecting histamine or C48/80 plasma-induced extravasation. Secondly, blocking the H_2S-generating enzymes potentiated pruritus and the neutrophils influx triggered by C48/80. Pretreatment with glibenclamide (10 mg/kg; i.p., -30 min.), a K_{ATP} channel blocker, did not reverse the effect of the fast-release H_2S donor on acute pruritus and inflammation induced by histamine. Finally, psoriatic animals, treated with GYY4137 (i.p.) showed a lower skin inflammation (PASI scores) and pruritus as well as the NFκB-Caspase1-IL-1β axis inhibited ($P>0.05$), and increased activity of antioxidant enzymes (catalase, GST, GR and GPx). The skin of psoriatic animals exhibited a lower capacity to synthetize H_2S, which was parallel to expression of the enzyme Cystathionine-β-synthetase (CBS). The Cystathionine-γ-lyase (CSE) enzyme blocker did not interfere with the PASI or pruritus score. We may conclude that H_2S donor molecules represent new therapeutic targets to the control of acute or immune-mediated inflammation associated with the perception of acute or chronic pruritus. Also, in the acute inflammatory microenvironment, the mechanism involved is independent of K_{ATP} channels activation, whereas in the chronic condition it is partly dependent on the inhibition of NF-kB-caspase-1-IL-1β axis activation and increased antioxidants defence.

Keywords: Hydrogen sulphide, Pruritus, Cutaneous inflammation, Psoriasis, Histamine, GYY4137, Antioxidant activity, Mice.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviações	Por extenso
3MP	3-mercaptopiruvato
3MST	3-Mercaptopiruvato sulfurtransferase
AOAA	Ácido amino-oxiacético
ATM	Ourotiomalato de Sódio
BAM8-22	Peptídeo 8-22 da medula adrenal bovina
BCA	β-ciano-L-alanina
BSA	Albumina de soro bovino
C48/80	Composto 48/80
CAT	Cisteína aminotransferase
CBS	Cistationina-β-sintetase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CGRP	Peptideo vasodilatador relacionado ao gene da calcinoncina
CSE	Cistationina-γ-liase
DMEM	Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
GST	Glutationa S-transferase
H&E	Hematoxilina e Eosina
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfónico
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônia
IL	Interleucina

IMQ	Imiquimode
INF	Interferon
KRP	Krebs-ringer Fosfato
LR	Reagente de Lawesson
M2VP	1-metil-2-vinilpiridínio trifluorometanossulfonato
MPO	Mieloperoxidase
Mrgpr	Receptores acoplados *à* proteína G relacionados ao Mas
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAR	Receptor Ativado por Proteinase
PLC-beta	Fosfolipase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido Dismutase
SP	Substancia P
TLR	Receptores do tipo toll
TNB	Ácido tionitrobenzóico
TNF	Fator de necrose tumoral
TRPA1	Receptor de Potencial transiente Anquirina tipo 1
TRPV1	Receptor de Potencial transiente Valinoide tipo 1
TrxR	Tiredoxina Redutase
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática das vias de condução para o prurido..... 20
Figura 2 – Ilustração da pele normal e com psoríase. 22
Figura 3 – Biossíntese de H_2S em células de mamíferos.. 26
Figura 4 – Esquema representativo da indução e mensuração do prurido agudo. 35
Figura 5 – Diagrama detalhado sobre a mensuração de parâmetros inflamatórios.. 36
Figura 6 – Indução e análise da psoríase experimental.. 41
Figura 7 – Efeito do GYY4137 no comportamento de prurido em camundongos. 52
Figura 8 – Efeito do Na_2S sobre o comportamento de prurido induzido por C48/80 em camundongos. 53
Figura 9 – Efeito do GYY4137 no extravasamento plasmático induzido por histamina e C48/80 na pele dorsal de camundongos. 55
Figura 10 – Curva dose-efeito do GYY4137 no aumento da atividade da MPO frente à injeção i.d. do C48/80 na pele dorsal de camundongos.....56
Figura 11 – Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S sobre o prurido agudo induzido por C48/80. 57
Figura 12 – Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S sobre a atividade da enzima MPO induzida por C48/80.....58
Figura 13 – Geração de H_2S na pele dorsal naïve e inflamada. 59
Figura 14 – Efeito inibitório dos doadores de H_2S na desgranulação *in vitro* de mastócitos induzida por C48/80 *in vitro*.....60
Figura 15 – Efeito dos doadores de H_2S sobre a desgranulação de mastócitos no mesentério de ratos.....62
Figura 16 – Efeito dos doadores de H_2S sobre a desgranulação de mastócitos na pele dorsal de camundongos.. 63
Figura 17 – Bloqueio do canal de K_{ATP} não reverte o efeito protetor do Na_2S sobre o extravasamento plasmático e o prurido induzido por histamina. 65
Figura 18 – Relação dose e tempo-resposta da cloroquina na indução do comportamento de prurido em camundongos. 67
Figura 19 – Efeito do GYY4137 no comportamento de prurido induzido por cloroquina em camundongos. 68
Figura 20 – Caracterização dos sinais clínicos no modelo de psoríase experimental induzida por IMQ. 70
Figura 21 – Efeito do tratamento sistêmico com GYY4137 sobre os sinais da psoríase em camundongos.. 72
Figura 22 – Efeito do GYY4137 no prurido espontâneo em camundongos com psoríase induzida por IMQ.. 73
Figura 23 – Efeitos do tratamento sistêmico com GYY4137 na pele dorsal de camundongos com psoríase. 75
Figura 24 – Efeito do GYY4137 no número de leucócitos totais no baço e sangue periférico de camundongos com psoríase induzida por IMQ.. 76

Figura 25 – Efeito do tratamento com GYY4137 sobre os leucócitos circulantes em camundongos com psoríase induzida por IMQ. 78
Figura 26 – Efeito do GYY4137 sobre a atividade de enzimas antioxidantes na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ 80
Figura 27 – Efeito do tratamento com GYY4137 sobre a concentração de citocinas na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ..... 82
Figura 28 – Efeito do tratamento com GYY4137 sobre a ativação do NF-κB na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ.. 83
Figura 29 – Avaliação do tratamento com o GYY4137 sobre a expressão de caspase-1 (p10) na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ 84
Figura 30 – Avaliação do tratamento com o GYY4137 sobre a expressão de IL-1β na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ..... 85
Figura 31 – Avaliação da síntese de H_2S pela formação de sulfeto de chumbo em tecidos de camundongos naïve.. 87
Figura 32 – Efeito da psoríase experimental induzida por IMQ sobre a síntese de H_2S na pele dorsal de camundongos.. 88
Figura 33 – Avaliação da psoríase experimental induzida por IMQ sobre a expressão de enzimas geradoras de H_2S na pele dorsal de camundongos. 90
Figura 34 – Efeito da inibição da enzima CSE sobre o desenvolvimento da psoríase experimental induzida por IMQ. 92
Figura 35 – Efeito da inibição da síntese endógena de H_2S sobre a contagem de células totais no sangue periférico e alterações no baço dos animais com psoríase induzida por IMQ. 93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 Prurido agudo e crônico 18
1.2 Sulfeto de hidrogênio (H_2S): histórico, biossíntese e catabolismo 23
1.3 Efeitos biológicos do H_2S 26
1.4 Justificativa do projeto 31
1.5 Objetivos e estratégias para alcançá-los 33
2 MATERIAL E MÉTODOS 34
2.1 Animais 34
2.2 Indução e quantificação do prurido agudo 34
2.3 Quantificação do extravasamento plasmático cutâneo 35
2.4 Quantificação da atividade da mieloperoxidase 36
2.5 Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S sobre o prurido agudo e o influxo de neutrófilos 37
2.6 Avaliação da produção de H_2S durante a inflamação aguda 37
2.7 Avaliação da desgranulação de mastócitos 38
2.7.1 Isolamento de mastócitos e quantificação da liberação de histamina via HPLC MS/MS 38
2.7.2 Análise da desgranulação de mastócitos por microscopia intravital 39
2.7.3 Análise histológica de mastócitos desgranulados na pele dorsal 39
2.8 Efeito do tratamento farmacológico com o bloqueador dos canais de K_{ATP} na ação anti-pruritogênica e anti-inflamatória do H_2S frente a histamina 40
2.9 Quantificação do prurido desencadeado por cloroquina e o efeito do GYY4137 40
2.10 Indução da psoríase experimental 40
2.11 Avaliação dos sinais clínicos e do prurido crônico na psoríase experimental 40
2.12 Quantificação de esplenócitos, leucócitos no sangue e de neutrófilos na pele dorsal 42
2.13 Análise histológica da pele 42
2.14 Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes na pele dorsal 43
2.14.1 Tioredoxina redutase (TrxR) 43
2.14.2 Superóxido dismutase (SOD) 44
2.14.3 Catalase 44

2.14.4 Glutationa peroxidase (GPx) 45
2.14.5 Glutationa redutase (GR) 45
2.14.6 Glutationa S-transferase (GST) 46
2.15 Determinação da razão entre os níveis de glutationa oxidada e a glutationa reduzida (GSSG/GSH) como marcador de estresse oxidativo 46
2.16 Quantificação de citocinas na pele dorsal de animais com psoríase 47
2.17 Quantificação do NF-κB na pele murina com psoríase 48
2.18 Avaliação da expressão proteica de Caspase-1, IL1β, CSE e CBS na pele dorsal de camundongos com psoríase 48
2.19 Quantificação da produção de H_2S na pele dorsal de animais com psoríase 49
2.20 Análise estatística 50
3 RESULTADOS 51
3.1 Efeito do doador de H_2S de liberação lenta, GYY4137, no prurido agudo induzido por vias histaminérgicas na pele murina 51
3.2 Efeito do doador de H_2S de liberação rápida, Na_2S, no prurido agudo induzido por vias histaminérgicas na pele murina 53
3.3 Curva dose-efeito do GYY4137 no extravasamento plasmático produzido por histamina e C48/80 na pele dorsal de camundongos 54
3.4 GYY4137 reduz o influxo de neutrófilos induzido por C48/80 na pele murina 56
3.5 Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S no prurido agudo na pele murina 57
3.6 Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S sobre o influxo de neutrófilos 58
3.7 Produção de H_2S na pele dorsal na inflamação aguda 59
3.8 Efeitos dos doadores de H_2S na desgranulação de mastócitos induzida por C48/80 60
3.8.1 Doadores de H_2S reduzem a liberação de histamina de mastócitos desgranulados por C48/80 in vitro 60
3.8.2 Doadores de H_2S reduzem a desgranulação de mastócitos induzida por C48/80 in vivo 61
3.9 Envolvimento dos de K_{ATP} no efeito protetor do H_2S no extravasamento plasmático e no prurido 64
3.10 Padronização da relação dose e tempo-resposta do prurido frente à cloroquina 66
3.11 Efeito do tratamento com GYY4137 no prurido induzido por cloroquina 68

3.12 Caracterização dos sinais clínicos no modelo de psoríase induzida por Imiquimode (IMQ) em camundongos 69

3.13 Relação dose-efeito do GYY4137 sobre os sinais clínicos na psoríase experimental 71

3.14 Relação dose-efeito do GYY4137 sobre o prurido espontâneo em animais com psoríase 73

3.15 GYY4137 atenua as alterações histopatológicas na pele murina com psoríase 74

3.16 Avaliação dose-resposta do GYY4137 sobre o número de leucócitos totais no sangue e baço de animais com psoríase 76

3.17 Avaliação dose-resposta do tratamento com o GYY4137 sobre a leucocitose em camundongos com psoríase 77

3.18 Efeito do GYY4137 sobre a atividade de enzimas antioxidantes na psoríase experimental . 79

3.19 Relação dose-efeito do GYY4137 sobre a concentração de citocinas na pele dorsal 81

3.20 Avaliação dose-efeito do GYY4137 na ativação do fator de transcrição NF-κB na pele dorsal de camundongos com psoríase 83

3.21 GYY4137 reduz de forma dose-dependente a expressão de caspase-1 na pele dorsal de camundongos com psoríase 84

3.22 Avaliação dose-efeito do GYY4137 na expressão de IL-1β na pele dorsal de camundongos com psoríase 85

3.23 Pele naïve produz H_2S 86

3.24 Redução na produção de H_2S na pele dorsal de animais com psoríase 88

3.25 A expressão de enzimas geradoras de H_2S é reduzida na pele murina com psoríase 89

3.26 O bloqueio da síntese de H_2S não agrava os escores (PASI) da psoríase 91

3.27 O bloqueio da síntese endógena de H_2S não interfere na celularidade e esplenomegalia no modelo de psoríase 93

4 DISCUSSÃO 94

5 CONCLUSÕES 108

REFERÊNCIAS 110

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prurido agudo e crônico

O prurido (coceira) em sua forma aguda, assim como a dor, serve como um mecanismo de autoproteção, pois ajuda a preservar o corpo de danos deflagrados por agentes externos lesivos/irritantes que tenham ultrapassado a barreira epidérmica e penetrado na pele, o ato de coçar-se é uma resposta motora que pode livrar o corpo do estímulo lesivo (Ikoma et al., 2006). Alterações na homeostase da pele, observadas principalmente em doenças dermatológicas, tais como urticária, eczema atópica, mastocitose cutânea, dermatites e psoríase, apresentam como sintoma comum o prurido crônico, neste contexto a sensação de coceira não possui valor protetor e pode causar grande prejuízo para a qualidade de vida dos seus portadores (Greaves, Wall, 1996; Yoshipovitch et al., 2003; Pettigrew et al., 2010*).*

Sabe-se que a coceira pode ser evocada por diversos mediadores, conhecidos coletivamente como pruritogênicos, no contexto do prurido, a histamina é o mediador mais amplamente estudado (Ikoma et al., 2006; Jeffry et al., 2011). Além disso, está bem estabelecido que a aplicação intradérmica (i.d.) de histamina na pele de mamíferos induz eritema reflexo-axônico, caracterizado por vasodilatação neurogênica e edema, decorrente da liberação de neuropeptídios, como a substância P (SP) e do peptídeo vasodilatador relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) liberados das fibras $CMi_{[hist+]}$ (Schmelz et al., 2000). Os efeitos da histamina, com relação à inflamação e coceira, decorrem preferencialmente da ativação dos receptores (metabotrópicos) H_1. Todavia, quatro subtipos de receptores para histamina (H_1 – H_4) são conhecidos (Hill et al., 1997; Oda et al., 2000), sendo o receptor H_4 também responsável por mediar o prurido (Bell et al., 2004; Dunford et al., 2007).

A histamina encontra-se amplamente distribuída no organismo, predominantemente estocada em grânulos intracelulares de mastócitos, juntamente com proteases e heparina de alto peso molecular, em concentrações que variam de 1 a 4 pg por célula (Church, Levi-Schaffer, 1997). Dados experimentais *in vivo* e *in vitro* mostram mecanismos de liberação de componentes granulares armazenados em mastócitos via emprego de ferramentas farmacológicas, como o composto 48/80 (C48/80). Essa ferramenta possui a propriedade de desgranular mastócitos via interação direta com estruturas receptoras (Proteína G_{i2} e G_{i3}) presentes na membrana dessa célula. Isto estimula sinalizações intracelulares, dependentes de fosfolipase C (PLCβ), que leva à síntese de segundos mensageiros e aumento de Ca^{2+}

intracelular, o qual favorece o rompimento de grânulos, liberando a histamina e outros mediadores do interior da célula (Sugimoto et al., 1998; Kim et al., 1999; Ohta et al., 2002; de Vasconcelos et al., 2011; Suh et al., 2011).

Além de atuar em receptores especificos (H_1 e H_4) para promover prurido, alguns estudos sugerem a co-participação dos receptores de potencial transiente (ex.: vanilóide - TRPV1). Nesse sentido, Shim et al. (2007), mostram que o pré-tratamento de camundongos com o antagonista de TRPV1 (capsazepina) reduz o comportamento de coceira induzido pela injeção i.d. de histamina. Os mesmos autores observaram que animais nocautes de receptores TRPV1 exibiram menor comportamento de coceira frente à histamina em relação aos selvagens (Shim et al., 2007). Estudos *in vitro* demonstram que a co-transfecção (cDNA) dos receptores H_1 e TRPV1 de ratos em cultura de células embrionárias de rim humano (HEK 293T) aumentam o influxo de correntes de Ca^{2+} após adição de histamina, comparado à cultura transfectada somente com receptores H_1. Mecanismos de sinalização intracelular, tais como ativação da PLCβ3 (Nicolson et al., 2002), foram propostos para explicar o *cross-talk* entre os receptores H_1 e TRPV1 na geração do prurido.

Além da importância dos receptores de potencial transiente (TRPV1) no prurido induzido por histamina, mecanismos que conduzem ao prurido independente da histamina destacam a importância do receptor de potencial transiente do tipo anquirina (TRPA1). Wilson et al. (2011), demonstraram que cloroquina (fármaco utilizado para o tratamento de malária) induz prurido através da ativação de receptores da família Mrgpr (Mas-related G protein–coupled receptor), subtipos A3 e C11, via mecanismo dependente de TRPA1. O agonista endógeno do receptor MrgprC11 foi identificado e denominado como BAM8-22 (Liu et al., 2011). Animais knockout para TRPA1 demonstraram acentuada redução do prurido, induzido por cloroquina e BAM8-22, quando comparados aos selvagens (Wilson et al., 2011).

Reforçando o conceito de vias independentes da histamina, foi demonstrado que a estimulação elétrica de baixa intensidade e alta frequência na pele evoca prurido em humanos, mas não causa o eritema resultante do reflexo-axônico típico da histamina, efeito esse característico da ativação das fibras $CMi_{[hist+]}$. Isto sugere que vias neuronais periféricas independentes participam da condução do prurido (Ikoma et al., 2005). De fato, duas populações de neurônios responsáveis pelo processamento da coceira foram identificadas no trato espinotalâmico de macacos, sendo uma população responsiva à histamina, e a outra à

mucunaina, uma cisteína protease presente nos tricomas da leguminosa *Mucuna pruriens*, típica de regiões tropicais (Figura 1; Davidson et al., 2007).

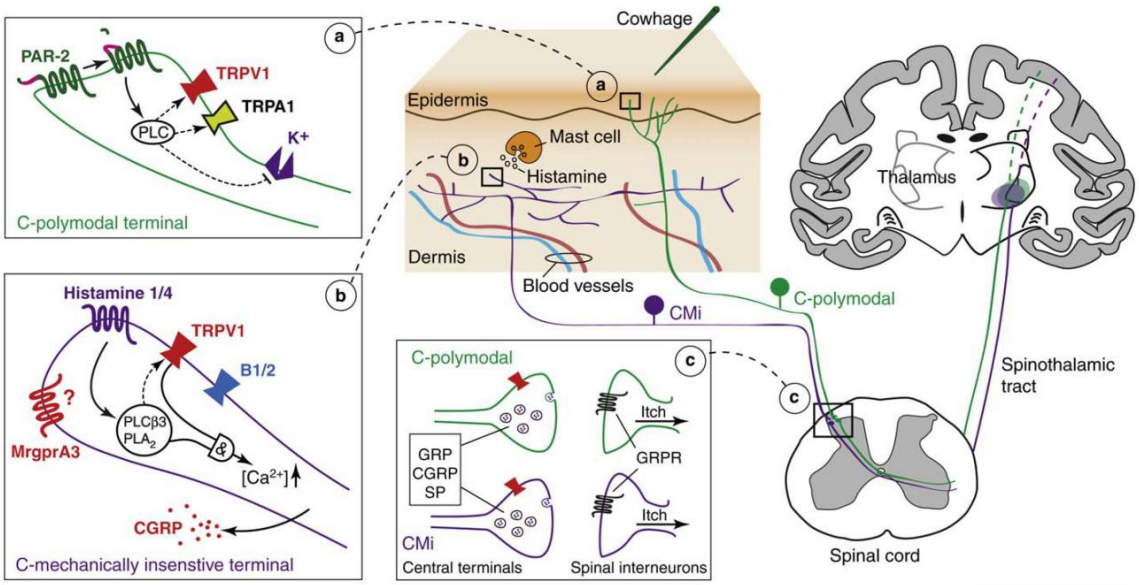

Figura 1 – Ilustração esquemática das vias de condução para o prurido. **(a)** fibras C polimodais ativadas por estímulos não histaminérgicos, mucunaina liberada de tricomas (*cowhage*), ativa PAR_2 no terminal sensorial. **(b)** ativação das fibras $CMi_{[hist+]}$ por histamina e outros mediadores como cloroquina (sob o receptor MrgpA3), esta ativação leva a liberação de mediadores pró-inflamatórios como SP e CGRP. **(c)** fibras aferentes polimodais C e $CMi_{[hist+]}$, estabelecem sinapses no corno da raiz dorsal na medula com neurônios de projeção, ascendendo para o tálamo.
Fonte: Davidson e Giesler, 2010.

Registros de potenciais de ação em fibras C no nervo fibular em humanos demonstraram que a mucunaina ativa nociceptores polimodais, mas não estimula as fibras $CMi_{[hist+]}$ (Namer et al., 2008). Os receptores ativados por proteinases do tipo 2 e 4 (PAR_2 e PAR_4; Reddy et al., 2008) são alvos da ação pruritogênica da mucunaina, os quais interessantemente estão também envolvidos no prurido de pacientes acometidos por dermatite atópica (Steinhoff et al., 2003). Reforçando tais achados, observou-se que a injeção i.d. de triptase em camundongos produz coceira, que foi inibida por FSLLRY-NH_2, um antagonista de receptores PAR_2 (Ui et al., 2006). É interessante acrescentar que, segundo Tsujii et al. (2008), os receptores PAR_1 e PAR_4 participam da indução do prurido via mecanismos que, em parte, dependem da liberação de histamina de mastócitos cutâneos, visto que o anti-histamínico H_1 (terfenadina) reduz o prurido induzido por agonistas dos receptores PAR_1 e PAR_4. O envolvimento dos receptores PAR_2 no prurido evocado por histamina foi descartado,

pois a terfenadina não inibiu o prurido evocado por agonistas dos receptores PAR_2, sugerindo que o prurido mediado por PAR_2 é dependente da ativação direta das fibras sensoriais.

Embora a literatura seja vasta no conhecimento de que a histamina e outros mediadores endógenos (proteases, neuropeptídeos, bradicinina e outros) e substâncias exógenas (toxinas, princípios ativos) estimulam positivamente vias de sinalização envolvidas na condução do prurido, os avanços na terapia desse sintoma ainda são discretos, resumindo-se preferencialmente aos fármacos anti-histamínicos. Todavia, essa terapia farmacológica nem sempre é satisfatória para o prurido agudo em pacientes refratários ou com prurido crônico, destacando assim a importância de mecanismos periféricos independentemente dos receptores de histamina (Handwerker, 2010).

Considerando que o prurido crônico é uma condição observada em muitas doenças dermatológicas, o tratamento deste sintoma é importante quando se considera a qualidade de vida do paciente, mas também no sentido de prevenir o agravamento de lesões na pele, provocadas pelo ato de coçar-se (Ikoma et al., 2006). Dentre as doenças dermatológicas, a psoríase é uma das mais comuns, sua prevalência é de aproximadamente 2 - 3% da população mundial. Existe pouco conhecimento sobre a etiologia desta doença, entretanto sabe-se que a psoríase esta relacionada com fatores genéticos e pode ser desencadeada após infecções, traumas, situações de estresse, consumo de álcool, entre outros (Mabuchi et al., 2012; Naldi, 2013).

Além do prurido intenso, os sinais dessa doença incluem formação de placas psoríaticas, de aspecto escamoso e eritematoso, principalmente na pele das articulações (cotovelos, joelhos), couro cabeludo, umbigo e região lombar. Morfologicamente, a pele afetada apresenta hiperplasia de queratinócitos, que induz espessamento da epiderme (acantose psoriasiforme), retenção do núcleo no estrato córneo (paraqueratose), infiltrado celular inflamatório, composto por neutrófilos e células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos), além de intensa angiogênese (Figura 2; Nograles et al., 2010; Naldi, 2013).

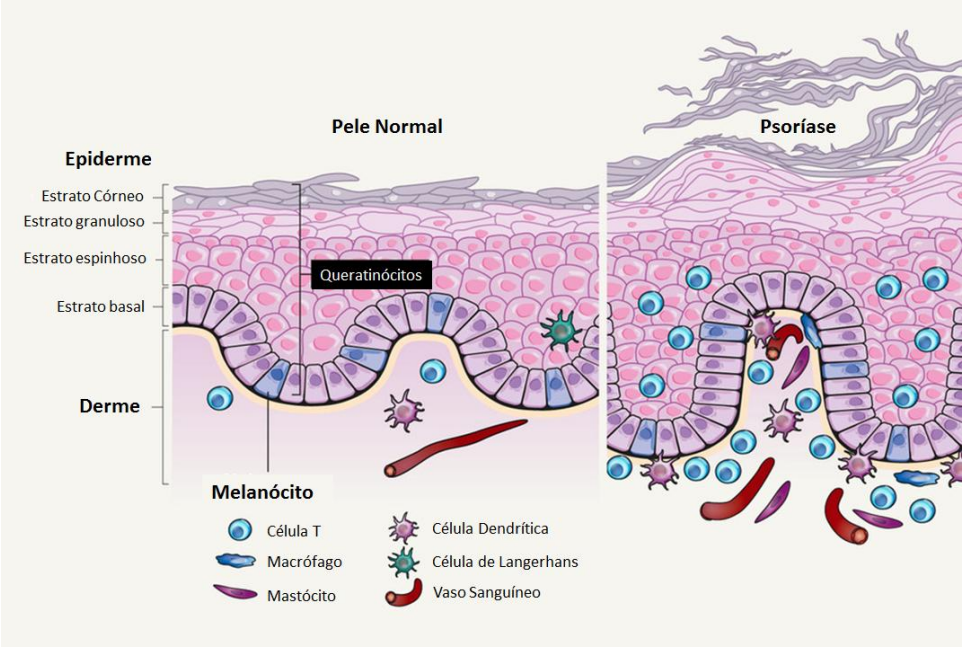

Figura 2 – Ilustração da pele normal e com psoríase. A pele com psoríase demonstra diversas alterações em sua estrutura, com destaque para hiperplasia de queratinócitos, infiltrado de células inflamatórias e angiogênese.
Fonte: Crow, 2012 (Adaptado).

Após ativação das células dendríticas, ocorre sua migração para os linfonodos e apresentação de antígenos para os linfócitos T. Após a apresentação dos antígenos, os linfócitos T diferenciam-se em células Th1 e Th2. As células Th1 secretam citocinas e quimiocinas, tais como intérferon γ (INF γ) e o fator de necrose tumoral α (TNFα), entre outras, em um sistema que favorece a manutenção da inflamação da pele na psoríase (Lima, Lima, 2011; Nestle et al., 2009).

A perpetuação da psoríase envolve alterações no sistema imune inato (queratinócitos, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células endoteliais) e no sistema imune adquirido (linfócitos T) (Bos et al., 2005; Sanchez, 2010). Muitos fatores ambientais são responsáveis pela ativação do sistema imune inato e desencadeamento do processo inflamatório na pele, entretanto a ativação de receptores do tipo *toll like* (TLR) por ligação com antígenos infecciosos parece atuar como um mecanismo alternativo no desencadeamento da psoríase (Nestle et al., 2009). Neste sentido, a utilização de Imiquimode (IMQ), um fármaco agonista de receptores TLR7 e TLR8, com atividade antiviral e antitumoral, para o tratamento de alterações na pele, como no tratamento tópico do vírus papiloma humano (HPV), foi relacionado com a exarcebação da psoríase em pacientes com a doença ou ainda

com o aparecimento da enfermidade em pessoas saudáveis (Gilliet et al., 2204; Fanti et al., 2006).

Modelos animais desenvolvidos para o estudo da psoríase confirmaram que o IMQ mimetiza em camundongos, os sinais e sintomas característicos da psoríase observados em pacientes com a doença (Gilliet et al., 2004; van der Fits et al., 2009; Sun et al., 2014; Flutter, Nestle, 2013).

1.2 Sulfeto de hidrogênio (H_2S): histórico, biossíntese e catabolismo

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um gás incolor, solúvel em água e com odor característico de ovo podre (Szabo, Papapetropoulos, 2017). Conhecido durante muito tempo como poluente ambiental, por décadas foi relacionando com casos de envenenamento de trabalhadores durante exposição ocupacional em diversas atividades industriais, entre elas a produção de celulose, fibra sintética, cerâmica, além do tratamento de esgoto urbano e reciclagem de lixo (Reiffenstein et al., 1992; Watt et al., 1997). Na indústria do gás natural o sulfeto de hidrogênio representa um grande problema, em especial para o segmento do gás ácido (gás natural com elevada concentração de enxofre). O enxofre pode ser reduzido para sulfeto de hidrogênio durante a prolongada degradação de material orgânico no subsolo, responsável por formar petróleo e gás natural. Em alguns campos de extração, o sulfeto de hidrogênio chega a atingir 35% da constituição do gás ácido. Destacando, assim, a necessidade de proteção durante a exposição ocupacional dos trabalhadores neste setor (Guidotti, 1994).

Um dos mecanismos responsáveis pela toxicidade do H_2S é decorrente da sua capacidade em bloquear a enzima citocromo C oxidase, inibindo a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, prejudicando o metabolismo energético (Khan et., 1990; Dorman et al., 2002). A curva de exposição/resposta para letalidade do H_2S é extremamente abrupta, onde os efeitos tóxicos no organismo são determinados principalmente pela sua concentração, ao invés de uma relação entre a concentração e o tempo de exposição (Guidotti, 1996). O limiar para percepção do odor do H_2S situa-se entre 0,01-0,2 ppm, enquanto os efeitos tóxicos iniciais como náusea, enxaqueca e lacrimejamento dos olhos ocorrem na faixa de 1-5 ppm, o aumento da concentração desencadeia efeitos tóxicos mais acentuados, como irritação dos olhos e pulmão (20-50 ppm), paralisia do nervo olfatório (150 ppm), edema pulmonar (250-

500 ppm), perda da consciência e morte por paralisia respiratória (500-1000 ppm) (Beauchamp et al., 1984).

Apesar do conhecido efeito tóxico, o entendimento sobre o H_2S ganhou uma nova perspectiva após a descoberta de sua síntese endógena em mamíferos (Stipanuk e Beck, 1982; Griffith, 1987) e posteriormente com primeiro relato da importância fisiológica deste gás por Abe e Kimura (1996), onde fora sugerido um papel neuromodulador para o H_2S no cérebro, por meio do aumento da resposta induzida por receptores NMDA em neurônios do hipocampo. Estes resultados alavancaram a pesquisa científica sobre este gás e sua participação em sistemas biológicos, deste então, muitos trabalhos descreveram o papel do H_2S em fenômenos fisiológicos e patológicos, entre eles regulação da pressão sanguínea (Yang et al., 2008; Roy et al., 2012; Dongó et al., 2017), secreção de insulina (Kaneko et al., 2006; Ali et al., 2007; Moustafa, Habara, 2016), nocicepção (Distrutti et al., 2006; Kawabata et al., 2007; Cunha et al., 2008; Teicher et al., 2017), inflamação (Chen et al., 2009; Dufton et al., 2012; Li et al., 2005; Zimmermann et al., 2017) dentre outros. Em virtude dos diversos resultados demonstrando a importância do H_2S durante a última década, sua imagem foi transformada de gás temido e desagradável a uma molécula com importante papel endógeno (Wang, 2012).

Atualmente o H_2S é considerado juntamente com o óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO), membro da família de mediadores biológicos denominados gasotransmissores (Szabo, 2007). A produção endógena do H_2S em mamíferos já foi descrita e diversas vias para sua síntese foram caracterizadas, onde as mais amplamente estudadas são decorrentes da ação das enzimas cistationina-γ-liase (CSE) e cistationina-β-sintase (CBS) ambas dependentes do co-fator 5'-fosfato de pirodoxal (vitamina B_6) (Stipanuk e Beck, 1982). As enzimas CBS e CSE utilizam principalmente L-cisteína como substrato para produção de H_2S (Fiorucci et al., 2006; Rose et al., 2017). Este aminoácido pode ser obtido diretamente da dieta alimentar, ou por meio de uma reação de condensação de serina com homocisteína, gerando cistationina e água em reação catalisada pela CBS, cistationina pode ser convertida para cisteína através da CSE. Além de cisteína, CBS e CSE podem utilizar outros substratos para síntese de H_2S. A enzima CBS pode catalisar a condensação de cisteína e homocisteína, gerando cistationina e H_2S (Chiku et al., 2009). Por sua vez, a enzima CSE pode utilizar homocisteína diretamente como substrato para síntese de H_2S ou cistina (dímero de cisteína), em uma reação que resulta na produção de piruvato, amônia e tiocisteína, subsequentemente CSE pode utilizar tiocisteína para produzir cisteína e H_2S (Figura 3).

Além do entendimento das vias de síntese de H_2S, muitos estudos concentram-se em caracterizar a distribuição tecidual destas enzimas. A enzima CBS é considerada como a principal fonte fisiológica de H_2S no SNC (Moore et al., 2003; Kimura, 2015). Inicialmente foi demonstrado que homogenatos do cérebro de ratos são capazes de produzir H_2S, e que este processo foi inibido por bloqueadores da CBS (hidroxilamina ou amino-oxiacetato), efeito não observado com bloqueadores da CSE (DL-propargilglicina ou β-ciano-L-alanina) (Abe e Kimura, 1996). Posteriormente a presença da CBS em áreas do cérebro de camundongos (hipocampo e cerebelo) foi confirmada por imunocitoquímica (Robert et al., 2003). Outros estudos também demonstraram sua presença em órgãos tais como rim (Roy et al., 2012), fígado (Kabil et al., 2011) e intestino (Martin et al., 2010). Com relação à distribuição da enzima CSE, sua expressão foi observada no pulmão (Fu et al., 2008), pâncreas (Nishimura et al., 2009), estômago (Fiorucci et al., 2005), fígado e rim (Ishii et al., 2004), sistema intrauterino (Patel et al., 2009) e cardiovascular (Hosoki et al., 1997; Zhao et al., 2001). Para revisões mais detalhadas sobre a síntese de H_2S e a expressão das enzimas, consultar (Kamoun, 2004; Łowicka e Bełtowski, 2007; Whiteman e Moore, 2009; Wang, 2012; Szabo, Papapetropoulos, 2017).

Recentemente outra via capaz de sintetizar H_2S foi caracterizada, esta ocorre através da enzima 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3MST) em conjunto com a cisteína aminotransferase (CAT), na presença de L-cisteína e α-cetoglutarato (Shibuya et al., 2009a; Shibuya et al., 2009b) e pode catalisar uma reação de transaminação entre L-cisteína e α-cetoglutarato para produzir 3-mercaptopiruvato (3MP) e L-glutamato, o 3MP é utilizado como substrato pela 3MST para produção de H_2S (Kimura, 2012; Figura 3). A expressão de 3MST foi demonstrada no cérebro (Shibuya et al., 2009a) e aorta (Shibuya et al., 2009b) de ratos. Existem ainda, as vias não enzimáticas que participam da geração de H_2S, embora a quantidade gerada represente uma parcela muito reduzida do total de H_2S produzido (Searcy e Lee, 1998).

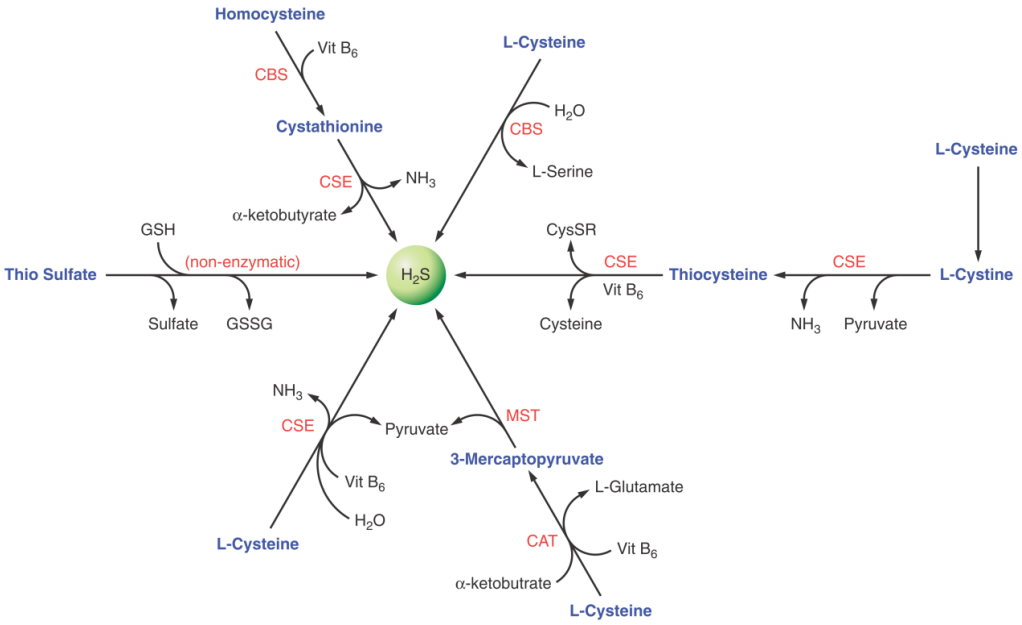

Figura 3 – Biossíntese de H_2S em células de mamíferos. Principais vias para síntese de H_2S, L-cisteína é o principal substrato para geração de sulfeto de hidrogênio a partir da CBS ou CSE, recentemente foi descrita a participação da via CAT/3MST neste processo. Produção não enzimática pode ocorrer, embora não contribua significativamente para geração total de H_2S. CBS – cistationina-β-sintase; CSE – cistationina-γ-liase; CAT – cisteína aminotransferase; 3MST (MST) – 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase.
Fonte: Wang (2012)

Endogenamente a metabolização do H_2S ocorre de diversas maneiras. Na mitocôndria, via oxidação para tiossulfato sendo convertido em sulfito e posteriormente em sulfato por ação da sulfito oxidase (Kimura, 2012). No citosol o H_2S pode sofrer metilação pela tiol-S-metiltransferase, originando metanotiol e dimetilsulfeto (Furne et al. 2001). Além disso, H_2S reagindo com a meta-hemoglobina gera sulfemoglobina (Łowicka e Bełtowski, 2007). Os metabólitos do H_2S são principalmente excretados pelo rim na forma livre ou conjugados (Liu et al., 2011).

1.3 Efeitos biológicos do H_2S

Semelhante a outros gasotransmissores, o H_2S também possui a capacidade de atravessar membranas celulares sem a utilização de transportadores específicos (Szabo, 2007). Sendo o H_2S um ácido fraco com pK_a de 6,76 a 37 °C, em solução aquosa pode encontrar-se em dois estados de dissociação: o ânion hidrosulfeto (HS^-, pK_a 7,04) e o ânion sulfeto (S^{2-}, pK_a 11,96). Em pH fisiológico (7,4) a 37 °C, cerca de 20 % do H_2S encontra-se na forma não

dissociada e o restante nas formas dissociadas (HS^- e S^{2-}). Atualmente não é totalmente compreendido se os efeitos biológicos produzidos pelo H_2S são decorrentes apenas da ação da forma não dissociada, ou pela combinação de espécies dissociadas e não dissociadas (Dombkowski et al., 2004; Hughes et al., 2009; Olson et al., 2014).

Apesar do enfoque toxicológico inicial (Burnett et al., 1977; Beauchamp et al., 1984), algumas descrições do passado relacionaram os efeitos benéficos dos banhos de lama ou águas termais para o tratamento de hipertensão, com a presença de H_2S em baixas concentrações nestes procedimentos (Sabo, 1950; Popovich, Gavrilishina, 1979). De fato, a ideia de que o H_2S possui papeis fisiológicos relevantes, tornou-se inegável após diversos estudos demonstrarem sua ação moduladora em fenômenos biológicos, aliado a descoberta da expressão constitutiva de enzimas geradoras e a presença de H_2S em diversos compartimentos corporais, veja revisão em Szabo (2017).

Aliado a isso, o desenvolvimento de animais knockout para as enzimas CBS e CSE, permitiu examinar o papel do H_2S na manutenção da homeostase dos organismos. Camundongos homozigotos knockout para CBS (-/-) apresentaram baixa taxa de sobrevivência e retardo no crescimento (Watanabe et al., 1995). Estudos utilizando camundongos homozigotos knockout para CSE (-/-) demonstraram que estes animais possuem maior viabilidade, porém a analise da pressão arterial (PA) destes animais demonstrou o desenvolvimento de hipertensão após 10 semanas de vida. Este fenômeno foi relacionado com queda de 50 % nos níveis plasmáticos de H_2S e com redução de 80 % na produção deste gás pela aorta e coração, quando comparados aos animais selvagens. A utilização de NaHS (doador de H_2S) reduziu de maneira dose/resposta a PA em animais CSE (-/-) e selvagens, contudo esta redução foi mais acentuada nos camundongos knockout, sugerindo maior sensibilidade ao H_2S nestes animais. (Yang et al., 2008).

Em outra abordagem para investigar o papel do H_2S endógeno na PA, Roy et al. (2012) administraram cronicamente inibidores das enzimas CBS e CSE em ratos com 8 semanas de idade, após a terceira semana de tratamento, o grupo de animais tratados com os inibidores apresentaram elevação significativa da PA em relação ao grupo tratado com veiculo. Em contrapartida ao efeito deletério da inibição ou deleção das enzimas sintetizadoras de H_2S, camundongos transgênicos superexpressando CSE, restritamente em cardiomiócitos apresentaram redução no tamanho do infarto do miocárdio, em um modelo de isquemia e reperfusão, este efeito foi relacionado com aumento na produção endógena de H_2S no miocárdio (Elrod et al., 2007).

Como citado acima, mudanças na síntese endógena de H_2S podem desencadear entre outros efeitos, alterações no sistema cardiovascular. Após os estudos de Abe e Kimura (1996), sugerindo que o H_2S é um neuromodulador no cérebro, pesquisadores do mesmo grupo (Hosoki et al., 1997), incentivados por resultados prévios da literatura, aos quais indicavam que o NO exercia atividade neuromodulatória no cérebro (Schuman e Madison, 1991; Zhou et al., 1993) e atuava como um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF-*endothelium-derived relaxing factor*) (Furchgott e Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1984; Palmer et al., 1987, 1988), demonstraram que H_2S foi capaz de promover de maneira dependente da dose o relaxamento do íleo de cobaia e veia porta de ratos. Além disso, observaram um efeito sinérgico do H_2S com o NO, na indução do relaxamento da aorta de ratos (Hosoki et al., 1997). Estes dados *in vitro* foram os primeiros resultados demonstrando papel vasorrelaxante para o H_2S.

O mecanismo de ação para o efeito vasorrelaxante do H_2S foi proposto apenas após os trabalhos de Zhao et al. (2001). Estes autores demonstram que diferentemente do NO e CO que induzem vasorrelaxamento através da ativação da guanilato ciclase e consequente aumento da síntese de GMPc, o H_2S induz vasorrelaxamento através da ativação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), via hiperpolarização do potencial de membrana das células musculares lisas vasculares. Efeito este mimetizado por pinacidil e bloqueado por glibenclamida, agonista e antagonista respectivamente do canal $K_{ATP.}$ Posteriormente outros estudos também demonstraram que o efeito vasorrelaxante induzido pelo H_2S é dependente da ativação dos canais K_{ATP} (Cheng et al., 2004; Leffer et al., 2011).

Além da ação vasorrelaxante, efeitos induzidos pelo H_2S via K_{ATP}, foram observados na proteção contra o stress oxidativo promovido por glutamato, em linhagem de células neurais (Kimura et al., 2006), no aumento da sobrevivência de camundongos em um modelo de sepse severa (Spiller et al., 2010), na redução da hipernocicepção mecânica desencadeada por PGE_2 (Cunha et al., 2008) e nocicepção visceral induzida por distensão colorretal (Distrutti et al., 2006), na redução do edema e infiltrado de leucócitos (Zanardo et al., 2006). A ativação do canal K_{ATP} é um dos principais mecanismos moleculares identificados para os efeitos celulares do H_2S.

Recentemente foi demonstrado que a ativação do K_{ATP} pelo H_2S é dependente da S-sulfidração, um processo que envolve a conversão de grupos tióis (-SH) de cisteína para persulfetos (-SSH) (Mustafa et al., 2009). O canal de K_{ATP} é um complexo proteico, formado por subunidades responsáveis por formarem o poro de condução para o K^+ (Kir6.x) e por

subunidades do receptor de sulfoniluréia (SUR). As subunidades do receptor SUR formam pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína na porção extracelular, o H_2S pode quebrar tais ligações e agir sobre os grupos tióis livres das cisteínas, induzindo mudanças na conformação do receptor SUR e consequente abertura do canal de K_{ATP} (Jiang et al., 2010).

A S-sulfidração pode ser responsável por diversos efeitos induzidos pelo H_2S. Este processo foi relacionado com o aumento da atividade catalítica da GAPDH (Mustafa et al., 2009), inibição do canal BK_{Ca} (Telezhkin et al., 2009) ou ativação de TRPA1 (Streng et al., 2008) e TRPV1 (Trevisani et al., 2005). Embora muitos efeitos do H_2S estejam relacionados com a modulação de canais iônicos, descrições da ação do H_2S sobre outros alvos moleculares, tais como o fator de transcrição nuclear kappa B - NF-κB (Tripatara et al., 2008) e o fator nuclear E2 - Nrf2 (Calvert et al., 2009) foram demonstradas.

Além da ativação do Nrf2, o H_2S pode promover proteção antioxidante, por outros mecanismos. Kimura e Kimura (2004) evidenciaram que o H_2S protege neurônios em cultura celular, da morte celular provocada por estresse oxidativo induzido por glutamato, através do aumento dos níveis de glutationa reduzida.

Entre os diversos fenômenos biológicos com participação do H_2S, o processo nociceptivo e principalmente o inflamatório, apresentam os resultados mais controversos. Muitos estudos demonstram papel anti-inflamatório (Chen et al., 2009; Elrod et al., 2007; Wallace et al., 2009; Zanardo et al., 2006) enquanto outros relatam papel pró-inflamatório (Collin et al., 2005; Qu et al., 2006; Zhang et al., 2010). Situação similar pode ser observada com relação ao processo nociceptivo, com estudos demonstrando efeito antinociceptivo (Cunha et al., 2008; Distrutti et al., 2006, 2010; Ekundi-Valentim., 2010) e também pró-nociceptivo (Kawabata et al., 2007; Lee et al., 2008; Nishimura et al., 2009). Recentes esforços buscando o entendimento para estes resultados contraditórios estão adicionado entendimento a questão (Whiteman e Winyard, 2011).

Para avaliar as ações do H_2S, grande parte dos estudos utiliza compostos doadores de H_2S. Abordagem similar ao que ocorre com o NO, utilizando compostos doadores como o nitroprussiato de sódio (Lamontagne et al., 2008). Os doadores de H_2S mais comumente utilizados são: hidrossulfeto de sódio (NaHS), sulfeto de sódio (Na_2S) e o reagente de Lawesson, estes compostos são denominados de doadores de H_2S de liberação rápida, termo relacionado com sua grande capacidade de liberar H_2S em solução aquosa rapidamente (Wang, 2012). O NaHS por exemplo, em solução, dissocia-se em Na^+ e HS^-, posteriormente HS^-, pode associar-se com H^+, resultando em H_2S. Acredita-se que em pH fisiológico (7,4) e

temperatura de 37 ºC, uma solução de NaHS origina cerca de 1/3 de H_2S, enquanto 2/3 irão permanecer na forma HS^-. (Beauchamp et al., 1984).

Em parte, os resultados controversos apresentados com relação ao fenômeno inflamatório e nociceptivo, podem estar relacionados com a utilização de diferentes doadores de H_2S e uma possível variação da proporção de H_2S gerado por cada um destes. Adicionalmente existe grande variedade sobre a dose/concentração utilizada em cada estudo. Neste sentido resultados obtidos por Elrod et al. (2007), utilizando diversas doses de Na_2S (10–500 µg/kg), para investigar o papel do H_2S no infarto do miocárdio induzido por isquemia e reperfusão, demonstraram que os efeitos benéficos do Na_2S (redução do tamanho da área infartada), ocorreram principalmente com as doses intermediarias (50 e 100 µg/kg). A maior dose utilizada (500 µg/kg) reverteu o efeito cardioprotetor. Similarmente foi demonstrado que o NaHS, quando administrado na dose de 10 mg/kg, mas não em dose menor (5 mg/kg) ou maior (15 mg/kg), promoveu efeito anti-inflamatório na pancreatite induzida por ceruleina, reduzindo os níveis de quimiocinas (CCL2, CCL3, CXCL1), moléculas de adesão (E-selectina, P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) e a atividade da MPO, (Sidhapuriwala et al., 2009).

Estudo conduzido por Whiteman et al. (2010), utilizando cultura de macrófagos desafiados com LPS, forneceu um importante indicativo sobre a relação entre concentração de doador de H_2S e a resposta celular. Utilizando diversas concentrações de NaHS (50–1000 µM) estes autores observaram que houve redução na liberação de mediadores inflamatórios (PGE_2, TNFα e nitrito como medida da produção de NO) apenas na faixa intermediária (100 e 200 µM), nas concentrações menores ou maiores não houve redução, contudo, de forma interessante a maior concentração utilizada (1000 µM) induziu aumento da produção destes mediadores. Este perfil de resposta bifásica é similar ao observado nos estudos mencionados acima e destacam a importância da dose/concentração de doador de H_2S utilizada e a interpretação do H_2S como mediador pró ou anti-inflamatório.

A utilização de diferentes rotas de administração para os doadores de H_2S, também parece exercer influência sobre os resultados contraditórios observados. Em estudo conduzido por Matsunami et al. (2009), buscando avaliar o papel do H_2S na nocicepção, foi demonstrado que o NaHS administrado por via intracolônica, induziu comportamento nociceptivo relacionado com a dor visceral em camundongos, quando o mesmo doador foi administrado por via intraperitoneal (i.p), os animais não apresentaram comportamento nociceptivo. Distrutti et al. (2006) ao administrar NaHS por via intraperitoneal, observaram redução da

nocicepção induzida por colite em ratos. Estes dados indicam que a via de administração é outro fator importante na interpretação dos resultados obtidos com os doadores de H_2S.

O doador de H_2S, denominado GYY4137 (Li et al., 2008), foi o primeiro composto desenvolvido de uma classe de doadores de H_2S de liberação lenta. Esta molécula demonstrou consistentes efeitos anti-inflamatórios (Li et al., 2009; Whiteman et al., 2010). Em estudo comparativo, a taxa de liberação de H_2S por NaHS, foi extremamente alta e por curto período tempo, enquanto a liberação de H_2S por GYY4137 embora muito menor (cerca de 200 vezes), ocorreu de forma constante por longo período (Whiteman et al., 2010).

Os compostos doadores de H_2S de liberação lenta, cuja capacidade de liberação ocorre em menor proporção, mas de maneira sustentada, podem levar ao aumento da concentração de H_2S endógeno, de maneira mais próxima ao que provavelmente ocorre nos sistemas fisiológicos. Desta forma, compostos com diferentes taxas de liberação de H_2S, são opções úteis para sistemas biológicos que apresentem redução na produção de H_2S e necessitam de suplementação exógena.

1.4 Justificativa do projeto

Embora nos processos nociceptivo e inflamatório o envolvimento do H_2S seja ainda controverso. Nosso grupo demonstrou que a alodinia secundária e a inflamação articular observada no modelo de sinovite, induzida por carragenina em joelho de ratos foi marcantemente reduzida pelo tratamento local dos animais com doadores de H_2S reagente de Lawesson, reforçando o papel anti-inflamatório e anti-nociceptivo desse gás (Ekundi-Valentim et al., 2010; 2013). Neste sentido o grupo vem se dedicando a entender o papel do H_2S na inflamação e no processo sensorial.

A dor aguda é uma sensação sensorial, que funciona como um mecanismo de proteção para o organismo. Semelhantemente, o prurido também é considerado uma sensação sensorial de proteção, pois anuncia a presença, bem como permite a remoção de insetos, substâncias irritantes ou outro estímulo prejudicial, que tenham ultrapassado a barreira epidérmica e penetrado na pele (Bíró et al., 2007; Steinhoff et al., 2006). Ambas as sensações são conduzidas principalmente através de sensoriais do tipo C, no entanto existem divergências com relação ao compartilhamento ou especificidade de vias de condução (Schmelz, 2010).

De forma similar ao que ocorre com a dor, o prurido em uma condição crônica pode ser debilitante, apesar dos recentes avanços farmacológicos, particularmente com o

desenvolvimento de antagonistas do receptor H_4, aos quais demonstraram resultados promissores em estudos clínicos e pré-clinicos (Ohsawa e Hirasawa, 2012; Thurmond, 2015). Ainda existe a necessidade do desenvolvimento de uma terapia farmacológica satisfatória para o tratamento do prurido crônico, frequentemente associado com doenças inflamatórias da pele, como o observado na psoríase ou dermatite atópica. (Gutzmer et al., 2011).

Não obstante, os mecanismos de ação envolvidos no fenômeno da coceira são discrepantes e dependem do estimulo. A descoberta e o delineamento de novos candidatos alternativos e/ou complementares para a terapia do prurido em sua forma aguda ou crônica (normalmente associado com inflamação crônica da pele) se faz necessária. Nesse sentido, estudo recente do nosso grupo (Rodrigues, 2017), forneceu a primeira evidencia, até o presente o momento, sobre a capacidade do H_2S regular o prurido induzido por vias histaminérgicas em camundongos.

Diante dos nossos achados, o interesse pela melhor compreensão do papel do H_2S (endógeno e exógeno) na informação sensorial relacionada ao prurido vem aumentando dentro deste grupo, visto que os mecanismos de sinalização (celular e molecular) do efeito protetor do H_2S no prurido evocado pela histamina bem como dos mecanismos operantes nas vias de prurido (receptores MrgprA3 e MrgprC11), independentes de histamina, são totalmente desconhecidos. Portanto, a caracterização dos mecanismos celulares (e moleculares) envolvidos no efeito anti-pruritogênico dos doadores de H_2S sobre o prurido dependente de vias histaminérgicas e não histaminérgicas é relevante, considerando-se o potencial terapêutico desse gás no prurido e doença de pele relacionada, como a psoríase de placa. Associado a isto, existe um total desconhecimento no tocante à farmacodinâmica/farmacocinética dos novos doadores de H_2S de liberação lenta, bem como do H_2S endógeno e suas enzimas relacionadas, no controle do prurido (agudo e crônico) e inflamação cutânea associada. Diante do exposto, os objetivos desta etapa foram:

1.5 Objetivos e estratégias para alcançá-los

1. Averiguar o efeito protetor do doador de H_2S de liberação lenta (GYY4137) sobre o prurido agudo e inflamação cutânea induzidos por estímulos de vias dependente e independente de histamina (ex.: cloroquina), bem como o efeito estabilizante de mastócitos *in vitro*.

Para tanto, injeções i.d. de estímulos irritantes foram realizados e o registro de comportamento de coceira, bem como inflamação (extravasamento plasmático e influxo de neutrófilos) foram mensurados via análise comportamental e testes de medida de extravasamento plasmático via emprego de albumina marcada com ^{125}I e atividade da MPO, respectivamente. Avaliação da desgranulação de mastócitos in vitro e in vivo.

2. Determinar o envolvimento dos canais de K_{ATP} nos efeitos anti-pruritogênico e anti-inflamatório dos doadores de H_2S de liberação rápida frente à injeção i.d. da histamina.

Para tanto, o bloqueio farmacológico desses canais foi realizado com o pré-tratamento dos animais com a glibenclamida, um antagonista dos canais de K_{ATP}.

3. Caracterizar a presença de enzimas envolvidas na síntese de H_2S cutâneo, bem como a capacidade de produção deste gás na pele saudável e doente.

Para isto, a expressão das diferentes enzimas (CSE e CBS) foi avaliada via Western blot. Já a medida da biossíntese local de H_2S foi realizada via método colorimétrico com base na formação de sulfeto de chumbo (Hine et al., 2015).

4. Padronizar/caracterizar o modelo de psoríase experimental em camundongos e avaliar o efeito do doador de H_2S de liberação lenta (GYY4137) sobre o prurido e o índice de severidade /sinais clínicos (PASI) relacionados à doença.

Para isto, análises funcionais e bioquímicas foram implementadas de acordo com van der Fits et al. 2009. A saber: prurido, espessamento (edema), escore de rubor e descamação da pele, leucograma, atividade enzimática antioxidante (ensaio colorimétrico) e concentração de citocinas via ensaio imunoenzimático (ELISA) no homogenato da pele. A ativação de caspase-1 e do fator de transcrição NF-κB foi realizada via técnica de Western blot e gel-shift, respectivamente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

O projeto foi desenvolvido sob aprovação do Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB - n° 100 nas fls 09 do livro 03). Camundongos machos isogênicos BALB/c (20 – 30 g) ou ratos Wistar (180 – 200 g), obtidos dos Biotérios do Departamento de Farmacologia, ICB/USP, foram utilizados em todos os experimentos. A eutanásia dos animais sempre ocorreu sob anestesia e foi realizada imediatamente após o término de cada experimento.

2.2 Indução e quantificação do prurido agudo

Os animais foram depilados na região dorsal, próximo ao pescoço, posteriormente foram aclimatizados individualmente, por aproximadamente 40 min, em caixas transparentes de acrílico (12 x 20 x 17 cm, Insight; Ribeirão Preto; SP) em ambiente adaptado com filmadora fixa (Sony Handycam DCR-PJ6) para o registro do comportamento animal. Após 24 h, os animais foram submetidos novamente ao processo de aclimatização por 20 min (Figura 4) e então, sob anestesia (isoflurano 2-4% em O_2), receberam a injeção i.d., na região dorsal, de uma única dose de C48/80 (3 µg/sítio), histamina (1 µmol/sítio), cloroquina 100 µg ou veículo (Tyrode), na presença e ausência dos doadores de H_2S de liberação lenta GYY4137 (0,3–30 nmol/sítio) ou rápida Na_2S (0,3–30 nmol/sítio), em volume de 50 µl (Costa et al., 2006).

Imediatamente após a injeção, os animais foram transferidos para sala de filmagem, onde o comportamento de coceira foi registrado durante 40 min. O comportamento de coceira é determinado pelo número de ataques de coceira, o qual é definido como um evento correspondente a três ou mais movimentos rápidos da pata traseira na região dorsal próximo ao local da injeção (Dunford et al., 2007). A quantificação dos ataques de coceira foi realizada por investigadores alheios ao estudo.

Figura 4 – Esquema representativo da indução e mensuração do prurido agudo. Animais foram injetados via i.d. com o veículo ou o agente pruritogênico (histamina 1 µmol, C48/80 3 µg ou cloroquina 100 µg) na presença ou ausência de doadores de H_2S (Na_2S ou GYY4137).

2.3 Quantificação do extravasamento plasmático cutâneo

Após a anestesia com uretano (2,5 g/kg; i.p), os camundongos receberam a injeção endovenosa de albumina marcada com I^{125} (100 µl, 0,037 MBq/µg) na veia caudal. A seguir, seis sítios aleatórios foram demarcados na pele dorsal dos animais e injetados i.d. com os agentes testes (Tyrode, C48/80, histamina) isoladamente ou co-injetado com os doadores de H_2S, GYY4137 e Na_2S (1–100 nmol). Após o intervalo de 30 min, a punção cardíaca foi realizada para obtenção de amostras de sangue (0,5–1,0 ml), estas foram centrifugadas (5 min,10.000 *g*) e o plasma coletado. Os sítios (8 mm) da pele foram removidos, pesados e levados ao contador γ (Packard Bioscience, Meriden, EUA) junto com o plasma (100 µl). O extravasamento plasmático foi expresso como ul de plasma por g de tecido ou porcentagem dos controles, histamina ou C48/80 isolados (Figura 5).

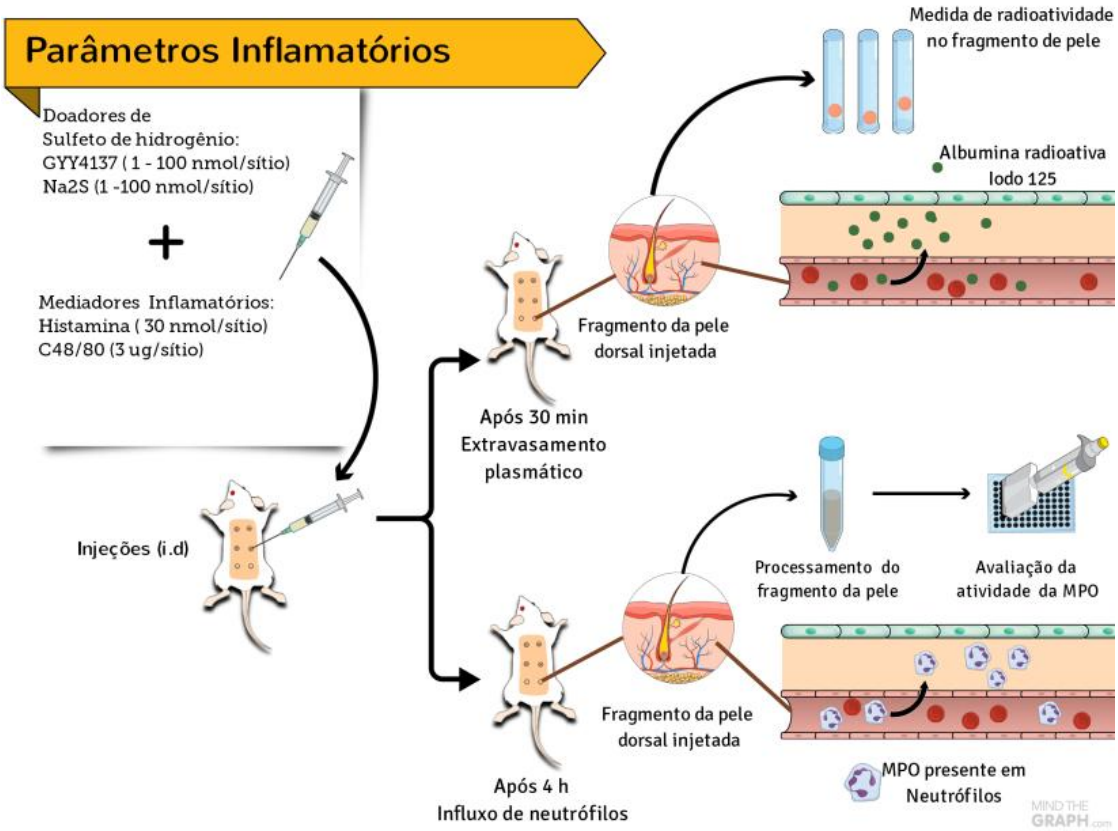

Figura 5 – Diagrama detalhado sobre a mensuração de parâmetros inflamatórios. Animais foram injetados i.d com mediadores inflamatórios (histamina 30 nmol ou C48/80 3µg) na presença ou ausência de doadores de H_2S (Na_2S ou GYY4137) em diversas doses. A mensuração do extravasamento plasmático ou do influxo de neutrófilos foi realizada após tempos específicos com base na quantificação de albumina marcada com ^{125}I e atividade da MPO, respectivamente.

2.4 Quantificação da atividade da mieloperoxidase

Após 4 h das injeções i.d., os animais foram submetidos à eutanásia mediante anestesia (isoflurano 5% em O_2) e os sítios da pele dorsal reservados. A quantificação do infiltrado de neutrófilos local foi realizada com base na medida da atividade da enzima MPO (Figura 5). Os sítios da pele coletados foram imersos em solução tampão (50 mg:1 ml) contendo o detergente brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB; 50 mg/ml em tampão fosfato de potássio, pH 6,0). Após dois ciclos (45 s/ciclo) de homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 g, 10 min, 4 °C) e aquecidas (60 °C; 2 h; Ohta et al., 2003). O sobrenadante de cada amostra (10 µl) foi incubado com tampão fosfato de potássio (200 µl; 50 mM; pH 6,0) contendo 0,164 mg/ml de dihidrocloreto de o-dianisidina em H_2O_2 (0,0005 %, pH 6) (Bradley et al., 1982). A reação nas amostras foi analisada via comprimento de onda específico (DO, 460 nm) em leitor Elisa (Spectra Max plus 384, Sunnyvale, CA, EUA). A

atividade da MPO nas amostras foi calculada em relação ao peso do tecido (mg), conforme a fórmula: MPO (U/mg) = Vmax/s x 60/0,0113/0,5, cuja U de atividade MPO é definida como aquela capaz de degradar um µmol de H_2O_2/min.

2.5 Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S sobre o prurido agudo e o influxo de neutrófilos

Indução e quantificação do prurido agudo

Para avaliação do prurido, os camundongos foram previamente aclimatizados (veja item *2.2*), após esse período, os animais foram tratados com ácido amino-oxiacético (AOAA, 20 mg/kg, i.p), inibidor não seletivo das enzimas CBS e CSE ou com β-ciano-L-alanina (BCA, 50 mg/kg, i.p), inibidor seletivo da enzima CSE (Asimakopoulou et al., 2013). Os animais controle foram injetados com salina. Após o período de 60 min, sob anestesia com isoflurano (2-4% em O_2), os animais foram injetados i.d. na região dorsal com uma dose única de C48/80 (3 µg/sítio) ou respectivo veículo (Tyrode), em volume de 50 µl (Costa et al., 2006). Imediatamente após a injeção, o comportamento de coceira foi registrado durante 40 min. O influxo de neutrófilos nos sítios injetados na região dorsal foi mensurado via medida da atividade de MPO.

Quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Após 4 h da injeção i.d. do C48/80, os camundongos foram submetidos à eutanásia sob anestesia (isoflurano 5% em O_2). Os sítios da pele dorsal foram coletados e a quantificação do infiltrado de neutrófilos local foi realizada com base na medida da atividade da enzima MPO, conforme descrito no item *2.4*.

2.6 Avaliação da produção de H_2S durante a inflamação aguda

Após o período de 30 min ou 4 h da injeção i.d. de Tyrode ou C48/80 3 µg por sítio, os camundongos foram submetidos à eutanásia sob anestesia (isoflurano 5% em O_2). Os sítios injetados foram coletados e processados para quantificação da produção de H_2S, com base na formação de sulfeto de chumbo, conforme descrito no item *2.19.*

2.7 Avaliação da desgranulação de mastócitos

2.7.1 Isolamento de mastócitos e quantificação da liberação de histamina via HPLC MS/MS

Ratos Wistar, sob anestesia com isoflurano, foram exsanguinados e, em seguida, o volume de 10 mL da solução Krebs-Ringer fostato (KRP; pH 7,4; composição em mM: NaCl 150, KCl 6,1, Na_2HPO_4 10, $MgSO_4$ 1,5, $CaCl_2$ 42,9 e glicose 5,6) foi injetado dentro da cavidade peritoneal. O abdômen foi cuidadosamente massageado e o fluido injetado foi removido juntamente com o exsudado peritoneal e centrifugado (300 x g, 5 min. 4 °C). Mastócitos da cavidade peritoneal de 6 animais foram purificados em um gradiente de Percoll (Enerback, Svenson, 1980). O pellet celular resultante foi resuspenso cuidadosamente em solução KPR (1 mL), ao qual foi transferido sobre um gradiente de Percoll e mantido em temperatura ambiente por 10 min, após centrifugação (150 x g, 25 min. 4 °C), a zona do gradiente contendo os mastócitos foi removida e lavada por duas vezes em solução KRP. A pureza da solução de mastócitos (95%) foi determinada através de análise de preparações microscópicas (Cytospin®), coradas com May–Grünwald Giemsa. A viabilidade dos mastócitos (98%) foi avaliada com base na exclusão por corante azul de Tripan.

Alíquotas da suspensão de mastócitos (500 µl; 4 x 10^5 cel/ml) foram aquecidas (37 °C, 10 min), doadores de H_2S (100–1000 µM) e C48/80 (1 µg/ml), foram adicionados na solução completando o volume final de 1 mL. Após 15 min de incubação, a reação foi interrompida pela transferência dos tubos para o gelo. As células foram então centrifugadas (300 g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante removido para quantificação de histamina. O pellet foi resuspenso em 1 mL de solução e a aquecido (100 °C/10 min), visando a liberação de histamina residual dos mastócitos. A concentração de histamina foi determinada por HPLC MS/MS e os resultados expressos como porcentagem do conteúdo total de histamina.

A concentração de histamina liberada de mastócitos foi analisada via cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS/MS). A cromatografia foi realizada em coluna analítica (Phenomenex kinetex 100A xb C18 2,6 µm) e uma fase móvel consistindo de acetonitrila, água (50/50, v/v) e 0,5 mM de ácido acético. O tempo de corrida cromatográfica utilizado foi de 2,5 min e a curva de calibração variou de 10-1000 ng/mL ($r^2 > 0.9897$; limite de quantificação: 10 ng/ml).

Amostras foram transferidas para tubos limpos e 20 mg de Sephadex G-25 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) foi adicionado, após agitação (40 s) e centrifugação dos tubos (6.000 g; 4 °C/ 10 min), alíquotas (200 µl) de amostras foram transferidas para microtubos de

vidro, vedados e inseridos em HPLC (HP Agilent 1100 HPLC; Minnesota, USA). MS foi realizada em um Espectrômetro de massa de estágio triplo – quadrupolo MS (Waters Corporation, Milford, USA). Os íons foram monitorados em um monitoramento de reação múltipla, a transição m/z 112,0 → 95,0 foi utilizada para quantificação de histamina, os dados foram analisados com o auxilio do software MassLynx™ 4.1, as curvas de calibração para os analitos foram construídas, usando a relação área/ pico histamina através de uma regressão linear ponderada ($1/x^2$). A relação área/pico histamina foi então interpolada utilizando a curva de calibração para obter os valores de concentração da histamina.

2.7.2 Análise da desgranulação de mastócitos por microscopia intravital

Utilizando uma mistura de cetamina e xilazila (100 e 10 mg/kg; i.p, respectivamente), ratos Wistar foram anestesiados, após este processo uma incisão longitudinal (3 cm) na região ventral foi realizada. O mesentério foi exposto e colocado sobre uma placa com controle homeotérmico (37 ºC) para observação microscópica (Dantas et al., 2002). A preparação foi continuamente superfundida com a solução de Ringer Locke (pH 7,2-7,4; 37 °C; composição em mM: NaCl 154; KCl 5,6; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2; $NaHCO_3$ 6; Glicose 5; ácido ascórbico 0,025).

Um volume de 30 μl de solução Tyrode (controle) ou C48/80 (10 μg) foi aplicado topicamente em um dos campos do mesentério. Alternativamente, 30 μl dos agentes testes Na_2S, LR ou GYY4137 (30 nmol) foi aplicado previamente (-2 min) no mesmo campo do mensentério que recebeu a aplicação de Tyrode ou C48/80. As imagens transiluminadas do mensentério foram capturadas utilizando microscopia intravital (DMLFS, Leica, Wetzlar, Alemanha; objetiva x40/0,80) o registro das imagens ocorreu por 3 min utilizando uma câmera de vídeo (DFC300 FX, Leica) acoplada a um computador e um monitor de TV. O número de mastócitos desgranulados ou intactos no mesentério foi determinado pela aplicação tópica de azul de toluidina (1%; 50 μl) ao término de cada experimento.

2.7.3 Análise histológica de mastócitos desgranulados na pele dorsal

Camundongos foram anestesiados com uretano (2,5 g/kg; i.p), sítios aleatórios na pele dorsal dos animais foram injetados i.d com Tyrode, C48/80 (3 μg/sítio) isolado ou co-injetado com Na_2S, reagente de Lawesson ou GYY4137 (30 nmol/sítio). Após 30 min, os sítios injetados (8 mm) foram removidos, fixados em formalina 4% e subquentemente emblocados em parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos, após coloração com azul de

toluidina (1%), as lâminas foram montadas. A contagem do número total de mastócitos íntegros e desgranulados foi realizada em microscópio óptico (Leica DM 2500; Suiça; x400).

2.8 Efeito do tratamento farmacológico com o bloqueador dos canais de K_{ATP} na ação anti-pruritogênica e anti-inflamatória do H_2S frente a histamina

O papel dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) foi averiguado pelo uso do bloqueador desses canais, a glibenclamida. Para isto, os animais foram pré-tratados com a glibenclamida (10 ou 30 mg/kg; i.p. – 30 min) e as medidas de prurido e inflamação cutânea foram avaliados conforme descrição nos itens *2.2* e *2.3*.

2.9 Quantificação do prurido desencadeado por cloroquina e o efeito do GYY4137

A indução e quantificação do prurido agudo foi realizada conforme descrito no item *2.2*. Inicialmente uma curva dose resposta (50, 100, 200 ou 500 µg/sítio) de cloroquina foi realizada e, em outro conjunto de experimentos, o doador de H_2S de liberação lenta GYY4137 (0,3–30 nmol/sítio) foi co-injetado com cloroquina (100 µg/sítio).

2.10 Indução da psoríase experimental

A pele dorsal dos camundongos foi depilada com auxilio de depilador (Panasonic ER389), seguida pela aplicação de creme depilatório (Veet). Após o intervalo de 48 h, iniciou-se a indução da psoríase pela aplicação tópica diária de 65 mg de IMQ creme 5% (Modik, Germed, São Paulo) na região dorsal e orelhas dos camundongos durante o período de 5 dias consecutivos, resultando numa dose diária de 3,25 mg do composto ativo IMQ (van der Fits et al., 2009). Paralelamente, o grupo controle recebeu 65 mg de vaselina durante o mesmo período. Acrescentaram-se ainda três grupos de animais com psoríase, que receberam concomitantemente o tratamento diário do doador de H_2S de liberação lenta, GYY4137, administrado sistemicamente (i.p) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg (Figura 6).

Em um conjunto independente de experimentos, durante a indução da psoríase por IMQ, os animais receberam a administração diária do inibidor da enzima CSE (BCA, 50 mg/kg, i.p).

2.11 Avaliação dos sinais clínicos e do prurido crônico na psoríase experimental

A área depilada da pele dorsal dos animais dos diferentes grupos foi fotografada (Sony Handycam DCR-PJ6), o registro ocorreu nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 6, a fim de avaliar sinais

(rubor e descamação), relacionados com a intensidade da psoríase. Foi utilizado um sistema de escore, baseado no índice de área e severidade da psoríase (PASI), comumente empregado na clínica médica, a saber: rubor e descamação (escore de 0 a 4), onde 0 = nada; 1 = leve; 2 = moderado; 3= intenso e, 4 = muito intenso. A análise inicial da acantose foi representada pelo aumento da espessura das orelhas, medida diariamente via auxílio de paquímetro digital (Starrett. Mod. 727), o resultado foi expresso em milímetros.

O registro comportamental de prurido espontâneo foi realizado por 30 min no 6º dia a partir da indução da psoríase, com o auxílio da filmadora/câmera digital (Sony Handycam DCR-PJ6). O registro gravado do comportamento foi disponibilizado em computador (LG All in One V320) e o número de ataques de coceira foi quantificado por investigadores treinados e alheios aos protocolos experimentais. O prurido foi expresso como, número de ataques de coceira espontâneos por intervalo de 30 min (Figura 6).

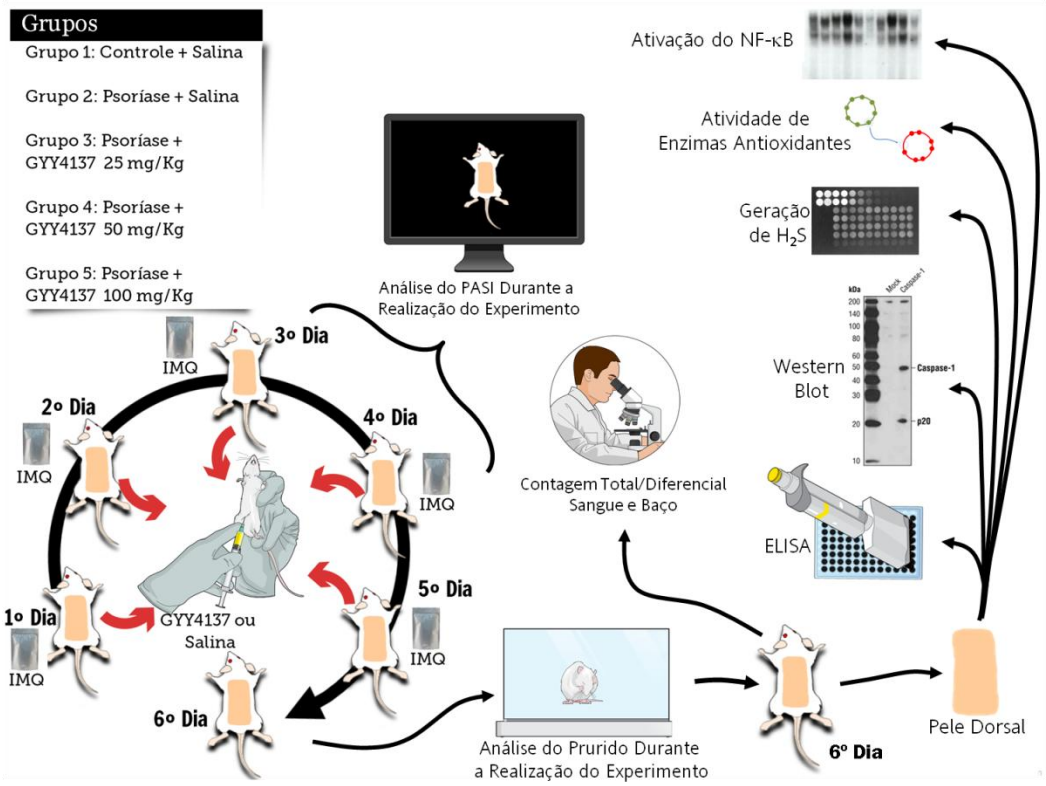

Figura 6 – Indução e análise da psoríase experimental. A psoríase foi induzida pela aplicação tópica (65 mg) de Imiquimode (IMQ), realizada entre o 1º e o 5º dia do experimento, o grupo controle recebeu vaselina. Concomitantemente à indução da psoríase, efetuou-se a administração sistêmica (i.p) de salina ou do doador de H_2S de liberação lenta, GYY4137 (25-100 mg). Durante o experimento, os animais foram filmados/fotografados para os registros do escore PASI e comportamento de prurido. Ao final do experimento (6º dia) os camundongos foram submetidos à eutanasia e amostras de fluidos e tecidos foram obtidas (sangue, baço e pele dorsal) e submetidas às diferentes análises.

2.12 Quantificação de esplenócitos, leucócitos no sangue e de neutrófilos na pele dorsal

Para obtenção das amostras biológicas, os animais foram continuamente anestesiados com a mistura de isoflurano (3%) em oxigênio (100%). O sangue periférico foi imediatamente coletado, via punção da aorta abdominal, enquanto o baço foi rapidamente removido e macerado em 5 mL de meio asséptico DMEM e, por fim, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Do sangue periférico coletado, foi retirado um volume de 10 µL e adicionado ao volume de 190 µL do corante cristal violeta (0,2%) para contagem do número total de células em câmara de Neubauer. A análise diferencial dos leucócitos do sangue periférico foi efetuada em esfregaços sanguíneos corados com May-Grunwald-Giemsa, e as células presentes no sangue periférico foram diferenciadas de acordo com a sua morfologia em neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos. Os dados foram expressos como número de células (x 10^6) por mL de sangue. O homogenato de esplenócitos coletado foi alíquotado (10 µL). A seguir, cada alíquota foi ressuspensa em 190 µL da solução de cristal violeta (0,2%). A quantificação do número total de células do homogenato final foi feita em câmara de Neubauer e o resultado foi expresso como número de esplenócitos (x 10^7) por mL.

A medida de influxo de neutrófilos na pele foi obtida com base na atividade da enzima MPO (veja item *2.4*), utilizando amostras da pele dorsal de camundongos dos diferentes grupos.

2.13 Análise histológica da pele

Amostras da pele dorsal foram removidas e fixadas em formaldeído (4%) por 8 h, à temperatura de 8 ºC. A seguir, as amostras foram submetidas às sessões de desidratação em etanol 70%, 95% e 100%, seguidas de xilol (I, II e III; 40 min) e, então, incluídas em parafina. Espécimes de 5 µm foram obtidos com o auxílio de micrótomo rotatório manual (820 Spencer Microtome) e, depois, montados em lâminas contendo Poly-L-Lysine. As lâminas foram então coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) e montadas para visualização sob microscopia óptica, conforme metodologia padronizada no laboratório (Ekundin-Valentim et al., 2010). As imagens foram capturadas em microscópio (Leica Microsystems DMC 2900, SP, Brasil) através do programa LAS V4.6 (Leica Microsystems), foram fotografados 25 cortes por grupo. Para determinação da espessura da epiderme foram realizadas 10 medidas por campo, através do programa Image-Pro Plus (MediaCybernetics Co., MD, USA).

2.14 Avaliação da atividade de enzimas antioxidantes na pele dorsal

A atividade de diferentes enzimas antioxidantes foi avaliada ao final do experimento (6º dia) em amostras da pele dorsal de animais controle e doente (psoríase) tratados (ou não) com o GYY4137. Para tal, as amostras de pele dorsal foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo EDTA 1 mM, na proporção de 1g de tecido para 10 ml de tampão. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 *g* durante 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram coletados para dosagem de proteínas e posterior dosagem das enzimas: tioredoxina redutase, superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase. A concentração de proteínas foi ajustada para 1 mg/ml em todas as amostras.

2.14.1 Tioredoxina redutase (TrxR)

A atividade da tioredoxina redutase (TrxR) foi determinada baseada na reação da redução de DTNB para TNB na presença de NADPH, o qual origina um produto amarelo que é detectado a 412 nm. Uma vez que várias enzimas presentes em amostras biológicas podem reduzir o DTNB, o método inclui a presença de ourotiomalato de sódio, um inibidor específico da TrxR (Hill et. al, 1997).

Vinte microlitros de sobrenadante foram pipetados em duplicata em microplaca e incubados em temperatura ambiente na presença de 140 µl de tampão de ensaio (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4 contendo cloreto de potássio 50 mM, EDTA 1 mM e BSA 0,2 mg/ml), 20 µl de NADPH 2 mM e 20 µl de DTNB 5 mM. As leituras foram monitoradas a 412 nm durante 10 min.

Em paralelo, também foram incubados os homogenatos na presença de ourotiomalato de sódio 20 µM (ATM, inibidor da TrxR) e os respectivos brancos: o sem amostra e o sem amostra e na presença do inibidor.

Os cálculos das atividades foram realizados utilizando-se o Vmax de cada reação (corrigidos pelos respectivos valores do branco da reação) e a partir do coeficiente de extinção 6800 M^{-1} cm^{-1}do DTNB a 412 nm. Os resultados foram expressos em UTrxR/mg de proteína, onde uma unidade de atividade de TrxR foi definida como a geração de 2 µmol de TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid) dependente de NADPH formado por minuto a 22 °C.

2.14.2 Superóxido dismutase (SOD)

A medida de atividade da SOD no tecido cutâneo foi baseada na formação do produto XTT-formazan, conforme (Ukeda et al., 1997). A reação ocorre entre xantina, xantina oxidase e SOD, gerando o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Por sua vez, este reduz o reagente XTT para o produto XTT-formazan, que absorve luz na OD de 470 nm. A SOD sequestra $O_2^{\bullet-}$ e reduz a formação do produto XTT-formazan.

As reações foram realizadas em microplaca e em duplicata. Para a determinação da atividade de SOD total, 10 ul de amostra (diluída 1:40 em tampão de homogeneização) foram adicionados a 260 µl de tampão carbonato de sódio 50 mM pH 10,2 contendo EDTA 3 mM, 10 µl de xantina 3 mM, 10 ul de XTT 0,75 mM e 10 ul de xantina oxidase 56,1 mU/ml. Em paralelo, para a determinação da atividade de MnSOD, incluiu-se KCN 2 mM no meio de incubação (Cu/Zn SOD não é afetada) e ainda, um terceiro tubo contendo amostra inativada por aquecimento durante 10 min a 100°C (branco de cada amostra).

A leitura foi realizada a 470 nm durante 20 min e o resultado foi expresso como USOD/mg proteína. U de atividade SOD foi definida como a quantidade de XTT não oxidado em umol/min (Ukeda et al., 1997).

2.14.3 Catalase

O método usado para a determinação da atividade da catalase ocorre em duas etapas. Na primeira reação, a catalase contida na amostra dismuta o H_2O_2 (de concentração conhecida) em água e oxigênio molecular. Em seguida, na segunda reação, o H_2O_2 remanescente é determinado pela oxidação do reagente o-dianisidina em uma reação catalizada pela enzima peroxidase (HRP, de acordo com o método modificado de Fossati *et al*., 1980).

A primeira reação foi realizada incubando-se 15 µL das amostras (diluídas 1:5 em tampão de homogeneização; brutas ou inativadas por incubação prévia a 60 °C durante 2h) com 250 µL de H_2O_2 10 mM em temperatura ambiente durante 10 min. A reação foi interrompida com 250 µL de NaN_3 1 mM. Em paralelo, amostras de uma curva padrão de H_2O_2 (preparada em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 nas concentrações de 11 a 8820 µM) também foram processadas).

A segunda reação foi realizada em microplaca pipetando-se 20 µL do produto obtido na primeira reação com 200 µL de reagente contendo 0,167 mg/ml de o-dianisidina e 0,095 µg/mL de HRP em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0.

A velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada registrando-se a absorbância da amostra a 460 nm. A atividade da catalase foi calculada a partir da velocidade máxima da reação de cada amostra corrigidas pelo respectivo valor do branco e em seguida, extrapolada em curva padrão de H_2O_2. O resultado foi expresso em UCatalase/mg de proteína. A unidade da catalase é definida como a concentração de H_2O_2 degradada (µmol/min) (Fossati et al., 1980).

2.14.4 Glutationa peroxidase (GPx)

Este método é baseado na medida indireta da atividade da GPx via reação associada a glutationa redutase (GR). A glutationa oxidada (GSSG), produzida pela redução de hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido via GR e NADPH (Flohé, Günzler, 1984). O substrato utilizado foi o terc-butil hidroperóxido.

Em uma microplaca de quartzo, 30 µL de amostra (diluídas 1:3 em tampão de homogeneização) foram incubados por 5 minutos à 37 ^{o}C na presença de 145 µL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 contendo EDTA 0,1 M, 5 µL de glutationa reduzida (GSH) 80 mM e 5 µL de glutationa redutase (GR) 0,0096 U/µL. Em seguida foram adicionados 5 µL de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 10 µL de solução de NADPH 1,2 mM.

A oxidação de NADPH a $NADP^+$ foi acompanhada pelo decréscimo na absorbância monitorada a 340 nm por 10 minutos à temperatura de 37 ^{o}C. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como µmol GSH/min/mg proteína (Flohé et al., 1984).

2.14.5 Glutationa redutase (GR)

A determinação da atividade foi baseada na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG em GSH de acordo com Carlberg e Mannervik (1985).

Em uma microplaca de quartzo, 10 µL de amostra (diluídas 1:5 em tampão de homogeneização) foram incubados à 37 ^{o}C na presença de 190 µL de um meio reacional

(tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 contendo EDTA 50 mM, GSSG 2 mg/ml e NADPH 0,4 mg/ml.

Assim, a reação oxidativa de NADPH para $NADP^+$ foi mensurada via decaimento da absorbância monitorada a 340 nm durante 30 min à 37 ^oC. As amostras foram analisadas em duplicata e expressas como µmol NADPH/min/mg proteína.

2.14.6 Glutationa S-transferase (GST)

O método da determinação da atividade da glutationa S-transferase foi realizada de acordo com Habig e colaboradores (1974), a qual é baseada na geração de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisado pela GST. O aumento de absorbância é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra, o qual foi mensurada a 340 nm por 30 minutos a 25 ^oC. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados expressos como µmol GSH conjugada/min/mg proteína (Habig et al., 1974).

2.15 Determinação da razão entre os níveis de glutationa oxidada e a glutationa reduzida (GSSG/GSH) como marcador de estresse oxidativo

O método da determinação das glutationas é também conhecido como método de reciclagem enzimática da glutationa (GSH, Rahman et al; 2006). A GSH é medida a partir da glutationa oxidada (GSSG) através da ação da glutationa redutase (GR) na presença de NADPH. A GSH reage com o ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) para formar o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) que é quantificado a 412 nm e o aducto glutationa de TNB (GS-TNB) que é então reduzida para GSH, semelhante ao GSSG pela GR e NADPH. Como a GR reduz o GSSG formando 2GSH, a quantidade de glutationa medida no ensaio, representa a soma de glutationa reduzida e oxidada na amostra (GSH total). Para a determinação de GSSG, esse método utiliza o reagente 1-metil-2-vinilpiridínio trifluorometanossulfonato (M2VP, “scavenger”) na preparação da amostra que evita a oxidação da GSH. O M2VP promove a eliminação do grupo tiol e rapidamente recupera a GSH, sem inibir a ação da GR.

Amostras de tecido de pele foram homogeneizadas em solução de ácido metafosfórico 5% (1 g de tecido para 10 ml da solução ácida) e em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 12.000 *g* por 20 min a 4 °C. Uma alíquota de 50 µl do sobrenadante foi

separada para a dosagem de GSH total enquanto outra de 45 µl para a dosagem de GSSG que foi imediatamente misturada com 5 µl de M2VP 30 mM. Todos reagentes foram preparados em tampão KH_2PO_4 100 mM, pH 7,5 contendo EDTA 5 mM (tampão de ensaio). A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1977).

As reações para ambas as dosagens foram realizadas em microplaca e em duplicata misturando-se 20 µl de amostra ou padrão com 120 µl de uma mistura previa de 1 volume de solução de DTNB 1,68 mM e 1 volume de GR 3,33 U/ml. Após 30 segundos, para a conversão de GSSG para GSH, a reação foi iniciada com 60 µl de NADPH 0,8 mM. As leituras de absborbância foram realizadas a 412 nm durante 3 min e registradas a cada 10 segundos. As quantidades de GSH total e GSSG foram calculadas a partir das Vmax de cada reação extrapoladas na respectiva curva padrão (com concentrações de 1–10 µM para GSH total e de 0,125–5 µM /para GSSG). Os resultados foram expressos em µmol/mg de proteínas e as concentrações de GSH foram determinadas pela diferença entre GSH total e GSSG. A partir daí, a razão GSSG/GSH foi determinada para cada amostra.

2.16 Quantificação de citocinas na pele dorsal de animais com psoríase

Utilizando amostras da pele dorsal de camundongos, as concentrações de diferentes citocinas foram mensuradas (TNF-α, IL-1β; IL-6, INF-γ; Biolegend, CA, USA e IL-10, R&D systems, MN, USA), via teste de ELISA, conforme instruções do fabricante.

As curvas padrões para TNF-α e IL-6 foram realizadas nas seguintes concentrações: 0 pg/mL (diluente do kit), 0,97 pg/mL, 1,95 pg/mL, 3,90 pg/mL, 7,81 pg/mL, 15,625 pg/mL, 31,25 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL. Já a curva para INF-γ foi efetuada nas concentrações de 0 pg/mL (diluente do kit), 1,95 pg/mL, 3,90 pg/mL, 7,81 pg/mL, 15,625 pg/mL, 31,25 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL. As padrões para IL-1β e IL-10 foram feitas nas concentrações de 0 pg/mL (diluente do kit), 3,90 pg/mL, 7,81 pg/mL, 15,625 pg/mL, 31,25 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 2000 pg/mL. Em todos os casos, a leitura das amostras foi efetuada em espectrofotômetro (Spectramax plus, Molecular Device, CA, USA), utilizando-se o comprimento de onda 450 nm.

2.17 Quantificação do NF-κB na pele murina com psoríase

Amostras da pele dorsal dos animais dos diferentes grupos foram homogeneizadas, seguindo as descrições de Rong e Baudry (1996). Após centrifugação do homogenato (12.000 g, 30 seg; 4 ºC), o sobrenadante foi reservado para os ensaios de Western blot. O botão celular (pellet) foi ressuspendido em 400 µl de tampão de lise (HEPES 10 mM; $MgCl_2$ 1,5mM; KCl 10mM; DTT 0,5mM; PMSF 0,5mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL) e reservado sob gelo por 10 min. Após agitação vigorosa das amostras, foi adicionado Tergitol NP-40 (10 %) e estas foram centrifugadas (12.000 g; 30 seg à 4 °C). O botão celular ressuspendido em tampão de extração (20 mM HEPES; 1,5 mM $MgCl_2$; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 2 µg/mL leupeptina; 2 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 3 mM ortovonadato; 0,5 mM DTT) foi reservado sob gelo e após nova centrifugação das amostras (12.000 g; 20 min à 4 °C), o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas determinada, conforme Bradford (1976).

O ensaio de retardo da mobilidade eletroforética para o NF-κB foi realizado de acordo com Munhoz et al. (2006). Para isto, foi utilizado kit específico de ensaio para gel shift (Promega). A sonda, um oligonucleotídeo consenso de dupla fita de NF-κB marcado com 32P (30.000 cpm), e o extrato nuclear (2,5 µg), o oligo frio em excesso ou o anticorpo específico para subunidades foram aplicados no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]. Para a eletroforese foi usado o tampão TBE (45 mM Tris, 45 mM Ácido Bórico, 0,5 mM EDTA). O gel foi submetido à eletroforese por 2 h a 150 V. Após a corrida, o gel foi secado e analisado por autoradiografia.

2.18 Avaliação da expressão proteica de Caspase-1, IL1β, CSE e CBS na pele dorsal de camundongos com psoríase

Após obtenção do sobrenadante da pele, conforme descrito no item 2.17, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 62,5 mM, pH 6,8 com SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001% e 2-mercaptoetanol 5%) e, em seguida, 20 µg de proteínas totais foram separadas via sistema de eletroforese em gel de poliacrilamina (12,5%, SDS-PAGE) com emprego de tampão específico (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%), e intensidade constante de voltagem de 110V (Laemmli, 1970). Feita a transferência eletroforética das bandas proteicas para membrana de nitrocelulose (200 mA, 1h30), a eficiência desse processo

foi confirmada pela coloração via emprego do corante vermelho ponceau (0,1% em ácido acético 5%). As ligações inespecíficas nas amostras foram bloqueadas pela incubação com albumina do soro bovino 5% (BSA, 5% em tampão TBS-t: Tri-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0,2%; pH 7,4) durante 1h.

As membranas foram incubadas (12 h, 4 °C) com anticorpos primários anti-caspase-1, monoclonal, coelho (#3866, 1:1000, Cell Signaling Technology); anti-IL1β, monoclonal, coelho (#12703, 1:1000, Cell Signaling Technology); anti-CSE, policlonal, coelho (12217-1-AP, 1:1000, Proteintech) e anti-CBS, monoclonal, camundongo (H00000875-M01, 1:1500, Abnova).

Após lavagens subsequentes com TBS-t (3 x por10 min), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário policlonal anti-camundongo ou anti-coelho IgG conjugado à peroxidase (1:4.000 em TBS-t, Signalway, EUA) durante 2 h em temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens com o TBS-t (3 x por 10 min), as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência (SuperSignal West pico, Thermo Scientific, EUA).

As imagens foram captadas pelo fotodocumentador Chemidoc (BioRad, EUA) e as análises densitometricas foram realizadas para quantificar a intensidade relativa utilizando o software ImageLab (BioRad, EUA). Os resultados obtidos foram normalizados pela intensidade relativa obtida pela proteína GAPDH, utilizada como controle do carregamento das amostras (anti-GAPDH, monoclonal, coelho, sc-32233, Santa Cruz). Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (vaselina).

2.19 Quantificação da produção de H_2S na pele dorsal de animais com psoríase

Inicialmente a capacidade de produção de H_2S foi avaliada em amostras de tecidos naïve, homogenizados em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), contendo o inibidor de proteases fenil-metil-sulfonil-fluoridro - PMSF (5 mM), na proporção 1:5 (1 g de tecido para 5 ml de tampão). O homogenato obtido foi centrifugado (10.000 g; 10 min, 4 °C) e o sobrenadante coletado e diluído (5 – 1.000 x) conforme o protocolo.

A seguir, o volume de 200 µl das amostras foi disposta em placa de 96 poços, juntamente com 12,5 µl do substrato L-cisteína (10 mM), 12,5 µl do co-fator 5’ fosfato de pirodoxal (2 mM), e 25 µl de tampão fosfato ou dos inibidores enzimáticos da geração de H_2S: PAG (DL-propargilglicina – 0,0002 - 10 mM, inibidor seletivo da CSE), BCA (β-ciano-

L-alanina – 0,0002 - 2 mM, inibidor seletivo da CSE) ou AOAA (ácido amino-oxiacético – 0,0002 - 2 mM, inibidor não seletivo da CBS e CSE). Em seguida, o papel filtro (12 x 8 cm) impregnado com acetato de chumbo foi disposto sobre a placa contendo as amostras, acima da fase liquida. A placa foi incubada por 40 – 240 min a 37 °C.

Após os testes com os tecidos naïve, foram definidos os melhores parâmetros (diluição-20 x; incubação-150 min, 37 °C) para avaliar a capacidade de geração de H_2S em amostras da pele dorsal de animais controle, psoríase e psoríase tratada com as diferentes doses de GYY4137.

A medida da geração de H_2S no papel filtro foi mensurada via formação de sulfeto de chumbo (Hine et al., 2015). Tal reação resulta da interação do H_2S produzido pelas amostras com o acetato de chumbo contido no papel, culminando numa coloração escurecida do precipitado de sulfeto de chumbo, que permite sua quantificação via análise densitométrica. Os dados foram expressos como quantidade de H_2S gerado por período ou concentração de proteínas totais, com base em uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de NaHS (1,95 – 500 µM), dispostas na mesma placa das amostras.

2.20 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. e submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma única ou duas vias, seguida pelo pós-teste de *Dunnett* ou de *Bonferroni*. Quando indicado, o teste *t* não pareado foi utilizado. As diferenças entre as médias foram avaliadas via programa estatístico (Programa Graph Pad Prism v. 5.0). Valores de $P<0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do doador de H_2S de liberação lenta, GYY4137, no prurido agudo induzido por vias histaminérgicas na pele murina

Conforme demonstrado no estudo prévio do grupo (Rodrigues et al., 2013), a injeção i.d. de histamina (1 µmol/sítio, n=6; Figura 7, painel A), na pele dorsal de camundongos BALB/c machos, induz aumento significativo no número de ataques de coceira/prurido durante o período de 40 min, em relação ao grupo tratado via i.d. com o veículo Tyrode. A co-injeção de histamina com doses crescentes de GYY4137 (0,3 – 30 nmol/sítio; n=6), reduziu significativamente o prurido apenas com a dose de 1 nmol/sítio (Figura 7, painel A).

Semelhantemente ao efeito observado com a histamina, a injeção i.d. de C48/80 (3 µg/sítio, n=7), induziu aumento expressivo no comportamento de prurido, em comparação aos animais que receberam veículo (Tyrode). Na vigência da co-injeção do C48/80 com GYY4137, em diferentes doses (0,3 – 30 nmol/sítio; n=7), não houve alteração na resposta observada com o C48/80 isolado (Figura 7, painel B). A administração isolada de GYY4137 na maior dose (10 nmol/sítio) evocou uma resposta similar ao observada com o Tyrode (Figura 7, painéis A e B).

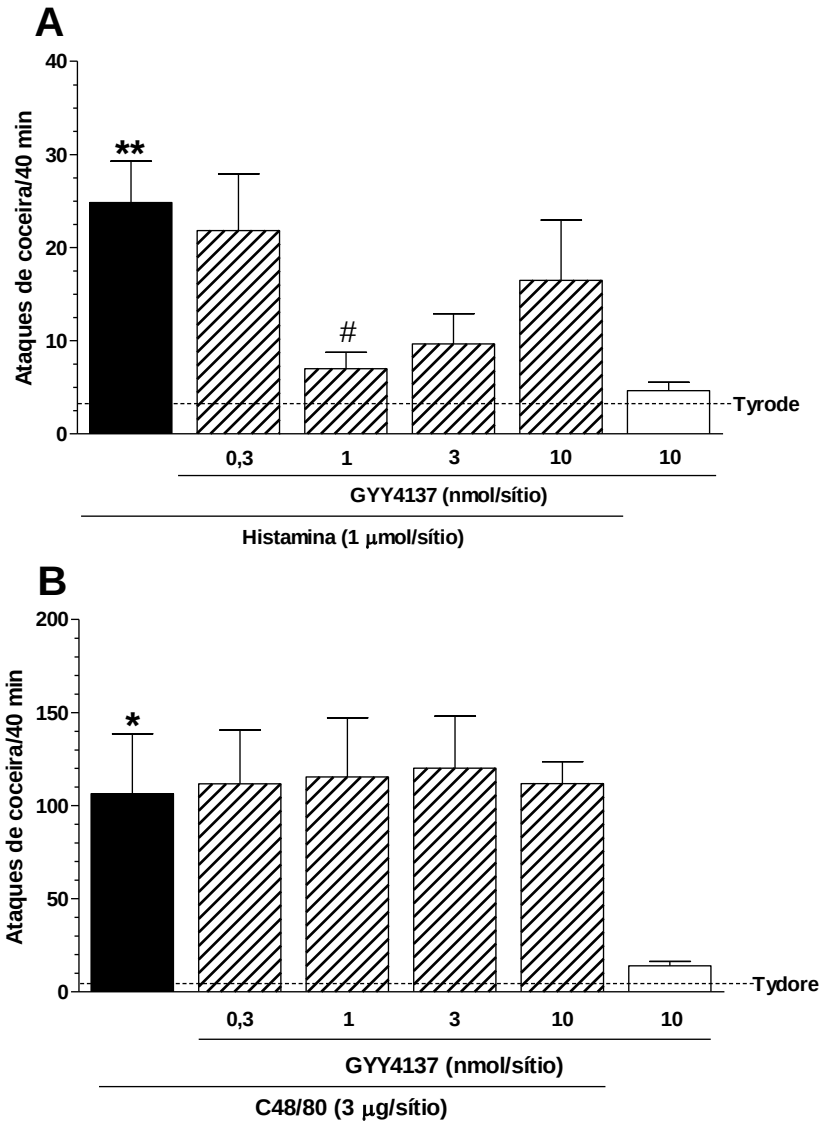

Figura 7 – Efeito do GYY4137 no comportamento de prurido em camundongos. Painéis A e B demonstram a média dos ataques de prurido induzidos por histamina e C48/80, respectivamente, no intervalo de 40 min, na presença ou ausência de doses crescentes de GYY4137 (0,3–10 nmol/sítio). A linha tracejada ilustra a resposta do Tyrode, a coluna branca o efeito isolado do GYY4137. n=6-7. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05–**P<0,01 *vs*. Tyrode, $^{\#}$P<0,05 *vs*. histamina isolada. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.2 Efeito do doador de H_2S de liberação rápida, Na_2S, no prurido agudo induzido por vias histaminérgicas na pele murina

Durante o período avaliado de 40 min, foi observado que a injeção i.d. de C48/80 (3 µg/sítio, n=7) na pele dorsal de camundongos produziu aumento significativo no número de ataques de prurido, quando comparado a injeção i.d. de Tyrode (n=4, Figura 8).

Na vigência da co-injeção do Na_2S, nas doses de 1, 3 e 10 nmol/sítio (n=5-6), com o C48/80, ocorreu redução significativa (P<0,05) no número de ataques de prurido, quando comparado com o C48/80 isolado (Figura 8). A co-injeção da menor dose de Na_2S (0,3 nmol/sítio, n=6), não afetou significativamente a resposta do C48/80 isolado.

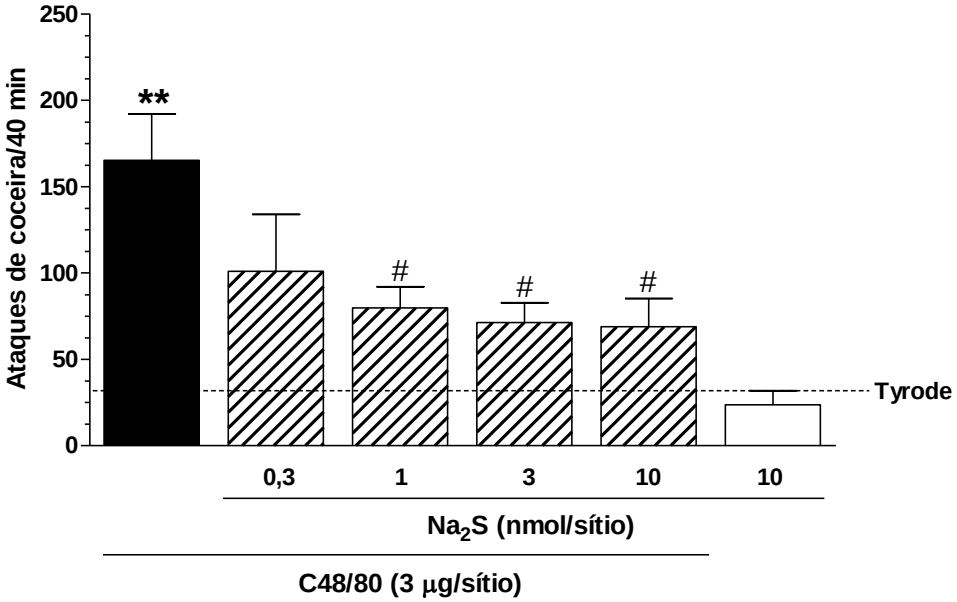

Figura 8 – Efeito do Na_2S sobre o comportamento de prurido induzido por C48/80 em camundongos. As barras indicam número de ataques de prurido no intervalo de 40 min pós injeção i.d. de C48/80 (3 µg/sítio), na ausência ou presença de doses crescentes de Na_2S (0,3–10 nmol/sítio). A linha tracejada ilustra a resposta do Tyrode e a coluna branca, o efeito isolado do Na_2S. n=4-7. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. **P<0,01 *vs*. Tyrode, $^{\#}$P<0,05 *vs*. C48/80 isolado. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.3 Curva dose-efeito do GYY4137 no extravasamento plasmático produzido por histamina e C48/80 na pele dorsal de camundongos

A injeção i.d. de histamina (30 nmol/sítio; n=14), na pele dorsal de camundongos, evocou extravasamento plasmático (Figura 9, painel A). A co-injeção de histamina com o GYY4137, nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100 nmol/sítio, não inibiu em nenhuma das doses avaliadas o extravasamento plasmático induzido por histamina (Figura 9, painel A; n=7-14). De forma semelhante, a injeção i.d. de C48/80 (3 µg/sítio; n=14) na pele dorsal de camundongos induziu extravasamento plasmático, que na vigência de co-injeção com diferentes doses do GYY4137 (1, 3, 10, 30 e 100 nmol/sítio; n=9-14) não foi afetado significativamente, embora observou-se tendência nas maiores doses (Figura 9, painel B). A maior dose de GYY4137 administrada isoladamente (100 nmol/sítio) induziu resposta similar ao Tyrode (Figura 9, painéis A e B).

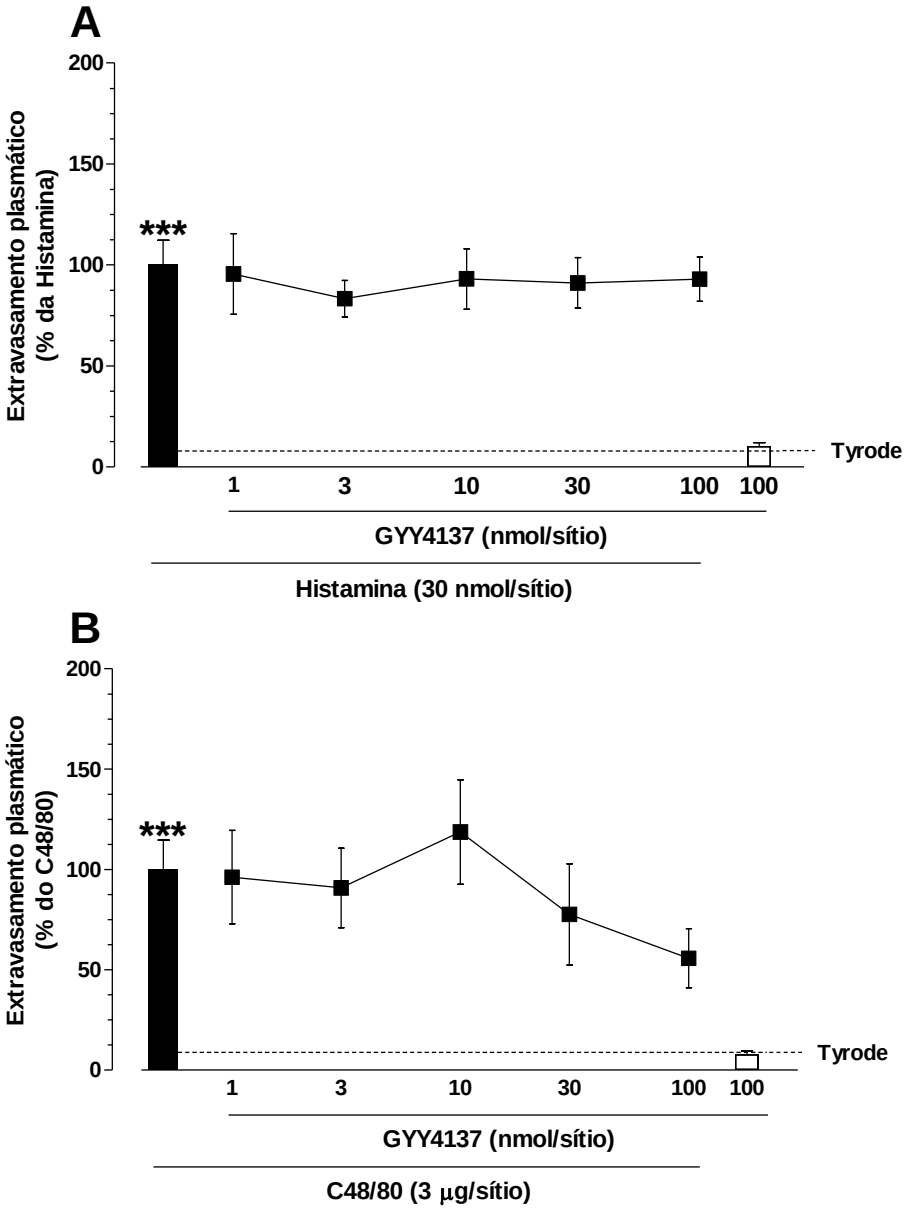

Figura 9 – Efeito do GYY4137 no extravasamento plasmático induzido por histamina e C48/80 na pele dorsal de camundongos. Os painéis A e B mostram o extravasamento plasmático pós injeção i.d. de histamina (30 nmol/sítio) e C48/80 (3 µg/sítio), respectivamente, na ausência ou presença de doses crescentes de GYY4137 (1–100 nmol/sítio). A linha tracejada ilustra o efeito do Tyrode e a coluna branca, o efeito isolado do GYY4137. n=9–14. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. ***P<0,001 *vs*. C48/80. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.4 GYY4137 reduz o influxo de neutrófilos induzido por C48/80 na pele murina

Após 4 h da injeção i.d. do C48/80 (3 µg/sítio; n=10) na pele dorsal dos animais, observou-se aumento significativo da atividade da MPO (Figura 10). A co-injeção do C48/80 com o GYY4137, nas doses de 3, 10, 30 e 100 nmol/sítio (n=10) reduziu de forma dose-dependente a atividade da MPO induzida pelo C48/80; todavia, somente na maior dose essa redução foi significativa. A administração isolada da maior dose de GYY4137 (100 nmol/sítio) induziu uma resposta semelhante ao observado com Tyrode (Figura 10).

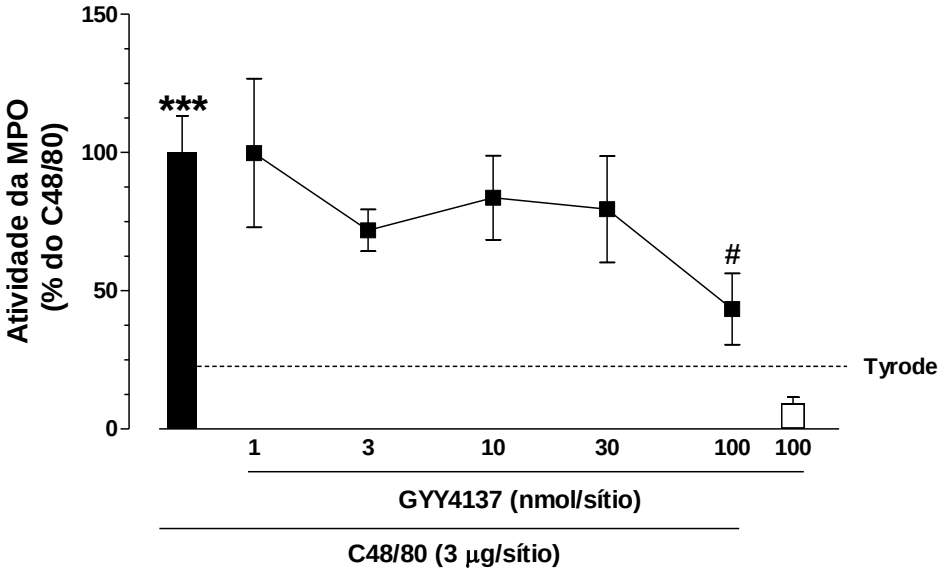

Figura 10 – Curva dose-efeito do GYY4137 no aumento da atividade da MPO frente à injeção i.d. do C48/80 na pele dorsal de camundongos. Atividade da MPO 4 h após injeção i.d. de C48/80 (3 µg/sítio), na ausência ou presença de doses crescentes de GYY4137 (1, 3, 10, 30 e 100 nmol/sítio). A barra branca ilustra o efeito do GYY4137 isolado, enquanto a linha tracejada representa a resposta do veiculo (Tyrode). n=10. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. ***P<0,001 *vs*. Tyrode, *P<0,05 *vs*. C48/80. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.5 Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S no prurido agudo na pele murina

A injeção i.d. de C48/80 3 µg/sítio (Figura 11, painéis A e B), na pele dorsal dos camundongos, induziu aumento expressivo (P<0,05–P<0,001; n= 4-8) no número de ataques de prurido, durante o período de 40 min em relação aos grupos injetados i.d com o veículo Tyrode. O pré-tratamento (-60 min, i.p.) dos animais com BCA, exacerbou significativamente (P<0,01), o comportamento de prurido induzido por C48/80, quando comparado aos animais pré-tratados com salina e injetados com C48/80 (Figura 11, painel A). Em contraste, o pré-tratamento (- 60 min, i.p.) com o AOAA não alterou o comportamento de prurido nos animais injetados com o C48/80 (Figura 11, painel B).

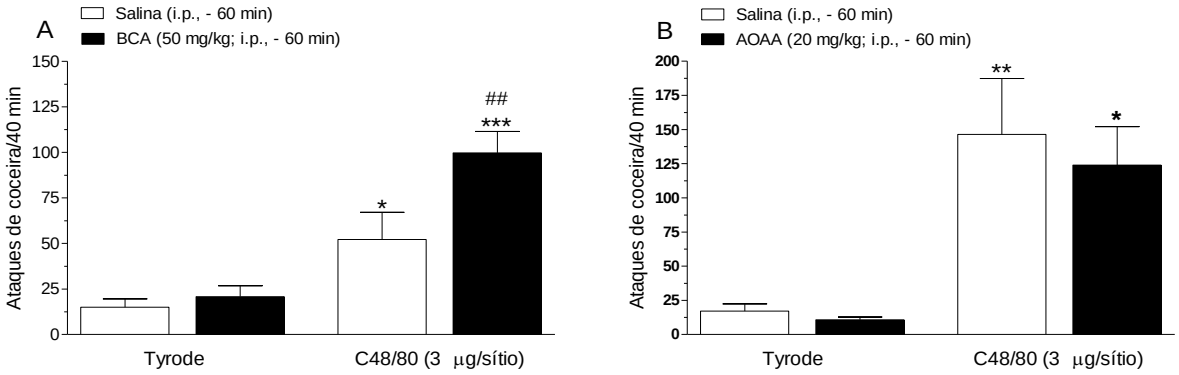

Figura 11 – Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S sobre o prurido agudo induzido por C48/80. Painéis A e B ilustram o efeito do pré-tratamento (-60 min) com BCA (50 mg kg, i.p) ou AOAA (20 mg kg, i.p), respectivamente, sobre o prurido agudo induzido por C48/80 (3 µg/sítio). n=4-8. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05-**P<0,01-***P<0,001 *vs* Tyrode. $^{\#\#}$P<0,01 *vs* C48/80 pré-tratados com salina (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni).

3.6 Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S sobre o influxo de neutrófilos

A administração i.d. de C48/80 3 µg/sítio (Figura 12, painéis A e B), induziu aumento significativo (P<0,05; n=4-8) na atividade da enzima MPO (utilizada como marcador do influxo de neutrófilos), quando comparado à injeção i.d. de Tyrode, observado na pele dorsal dos camundongos pré-tratados (-60 min, i.p.) com salina. A injeção i.d. de Tyrode no grupo pré-tratado com BCA (60 min, i.p), demonstrou aumento significativo (P<0,001) na atividade da MPO, em comparação aos animais injetados com Tyrode, pré-tratados com salina (Figura 12, painel A). Um perfil similar de resposta foi observado durante o pré-tratamento com AOAA, em que a administração i.d. de Tyrode elevou significativamente (P<0,05) a atividade da MPO neste grupo, quando comparado aos animais pré-tratados com salina. Adicionalmente, é possível observar uma elevação significativa (P<0,001) na atividade da MPO nos animais injetados com C48/80, pré-tratados com BCA, quando comparados aos animais injetados com C48/80, pré-tratados com salina (Figura 12, painel A).

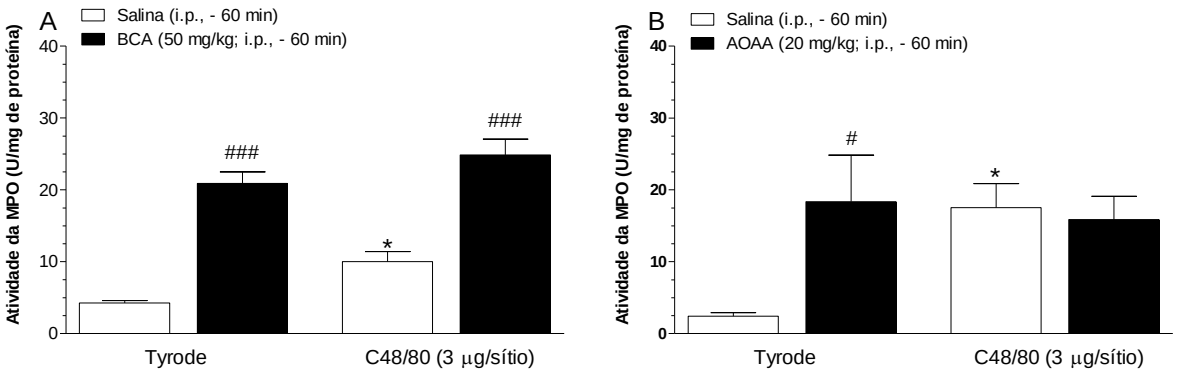

Figura 12 – Efeito dos inibidores das enzimas geradoras de H_2S sobre a atividade da enzima MPO induzida por C48/80. Painéis A e B ilustram o efeito do pré-tratamento (-60 min) com BCA (50 mg kg, i.p) ou AOAA (20 mg kg, i.p), respectivamente, sobre a atividade da enzima MPO, como medida de influxo de neutrófilos. n=4-8. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05 *vs*. Tyrode, $^{\#}$P<0,05-$^{\#\#\#}$P<0,001 *vs*. pré-tratado com salina. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni).

3.7 Produção de H_2S na pele dorsal na inflamação aguda

A análise da capacidade de produção de H_2S, em tecidos de animais naïve, demonstrou índices de geração de H_2S similares entre as amostras de cérebro e pele dorsal, enquanto a taxa de geração de H_2S foi mais acentuada no fígado (Figura 13, painel A).

Após 30 min da administração i.d de C48/80 (3 µg/sítio), houve aumento significativo ($P<0,05$), na capacidade de geração de H_2S em amostras da pele dorsal, quando comparado aos sítios injetados com Tyrode. Este efeito não foi observado após o período de 4 horas (Figura 13, painéis B e C).

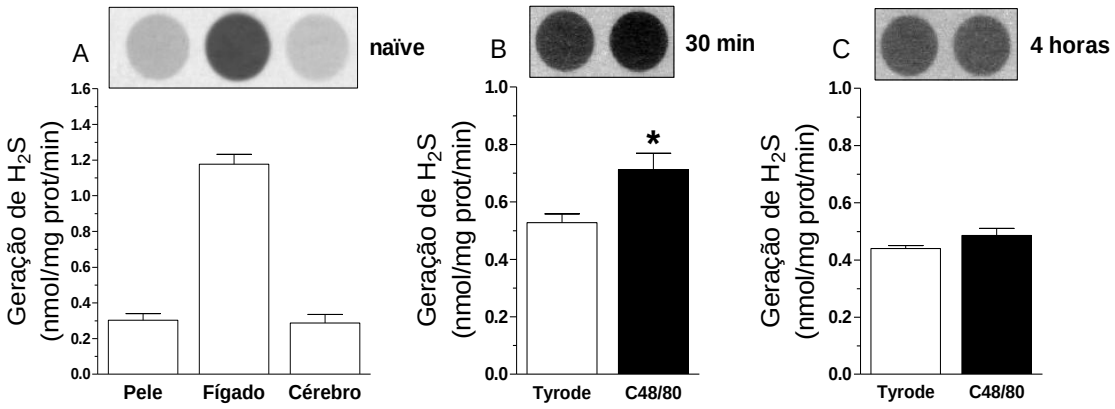

Figura 13 – Geração de H_2S na pele dorsal naïve e inflamada. Painel A demonstra a capacidade de geração de H_2S em amostras da pele dorsal, cérebro e fígado de camundondos naïve. Painéis B e C indicam o índice de geração de H_2S, 30 min e 4 horas após a injeção i.d. de Tyrode ou C48/80 (3 µg/sítio), respectivamente. n=4-5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *$P<0,05$ *vs*. Tyrode (Teste *t* não pareado).

3.8 Efeitos dos doadores de H_2S na desgranulação de mastócitos induzida por C48/80

3.8.1 Doadores de H_2S reduzem a liberação de histamina de mastócitos desgranulados por C48/80 in vitro

Como demonstrado na Figura 14 a incubação dos mastócitos, obtidos do peritônio de ratos, com o C48/80 (1 µg/ml) induz desgranulação destas células e consequente elevação significativa (P<0,001; n=3) do conteúdo de histamina, quando comparado ao conteúdo obtido de mastócitos incubados com o tampão KRP. A incubação simultânea dos mastócitos com o C48/80 e os doadores de H_2S, de liberação rápida (Na_2S ou reagente de Lawesson), em diferentes concentrações (100 µM – 1000 µM), reduz, significativamente e com perfil dose-dependente, o conteúdo liberado de histamina destas células (Figura 14, P<0,05–P<0,001; n=3). Já a incubação dos mastócitos com o C48/80 e o doador de H_2S de liberação lenta, GYY4137, nas concentrações de 100-1000 µM, não reduziu significativamente o conteúdo de histamina liberado dos mastócitos (Figura 14). Na presença dos doadores de H_2S isoladamente, o conteúdo liberado de histamina foi similar ao observado com os mastócitos incubados apenas com o tampão.

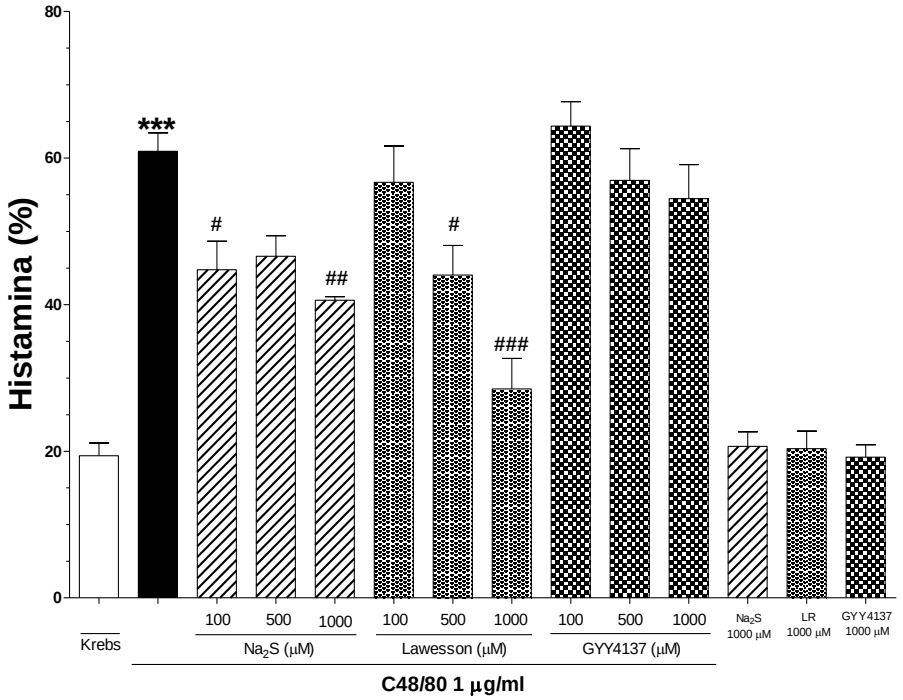

Figura 14 – Efeito inibitório dos doadores de H_2S na desgranulação *in vitro* de mastócitos induzida por C48/80 *in vitro*. Os doadores de H_2S: Na_2S, LR ou GYY4137 (100–1000 µM) foram incubados simultaneamente com o C48/80 (1 µg/ml). O conteúdo de histamina liberado foi expresso como porcentagem do total de histamina contida nas células. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. *n*=3. ***P<0,001 *vs*. Krebs (liberação basal), $^{\#}$P<0,05-$^{\#\#}$P<0,01-$^{\#\#\#}$P<0,001 *vs*. C48/80 isolado (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni).

3.8.2 Doadores de H_2S reduzem a desgranulação de mastócitos induzida por C48/80 in vivo

A aplicação de C48/80 (10 µg) no leito vascular mesentérico de ratos aumentou significativamente (P<0,001) o número de mastócitos desgranulados (4,0 ± 0,4; n= 5), quando comparados ao Tyrode (0,5 ± 0,2; n= 5; Figura 15, painéis A e B). A adição prévia (-2 min) de diferentes doadores de H_2S, Na_2S, LR e GYY4137 (30 nmol) no leito vascular mesentérico, reduziu significativamente (P<0,01–P<0,001) o número de mastócitos desgranulados por C48/80 (1,8 ± 0,9; 0,9 ± 0,5 e 1,5 ± 0,6; respectivamente, n=5; Figura 15, painéis C – F).

Adicionalmente ao observado com os mastócitos do mesentério de ratos. A análise histológica da pele dorsal de camundongos demonstrou que a injeção i.d de C48/80 (3 µg/sítio) desgranulou um grande número de mastócitos quando comparado aos animais naïve ou injetados com Tyrode (Figura 16, painéis A–C). A co-injeção de doadores de H_2S (30 nmol) com C48/80 reduziu o número de mastócitos desgranulados (Figura 16, painéis D–F).

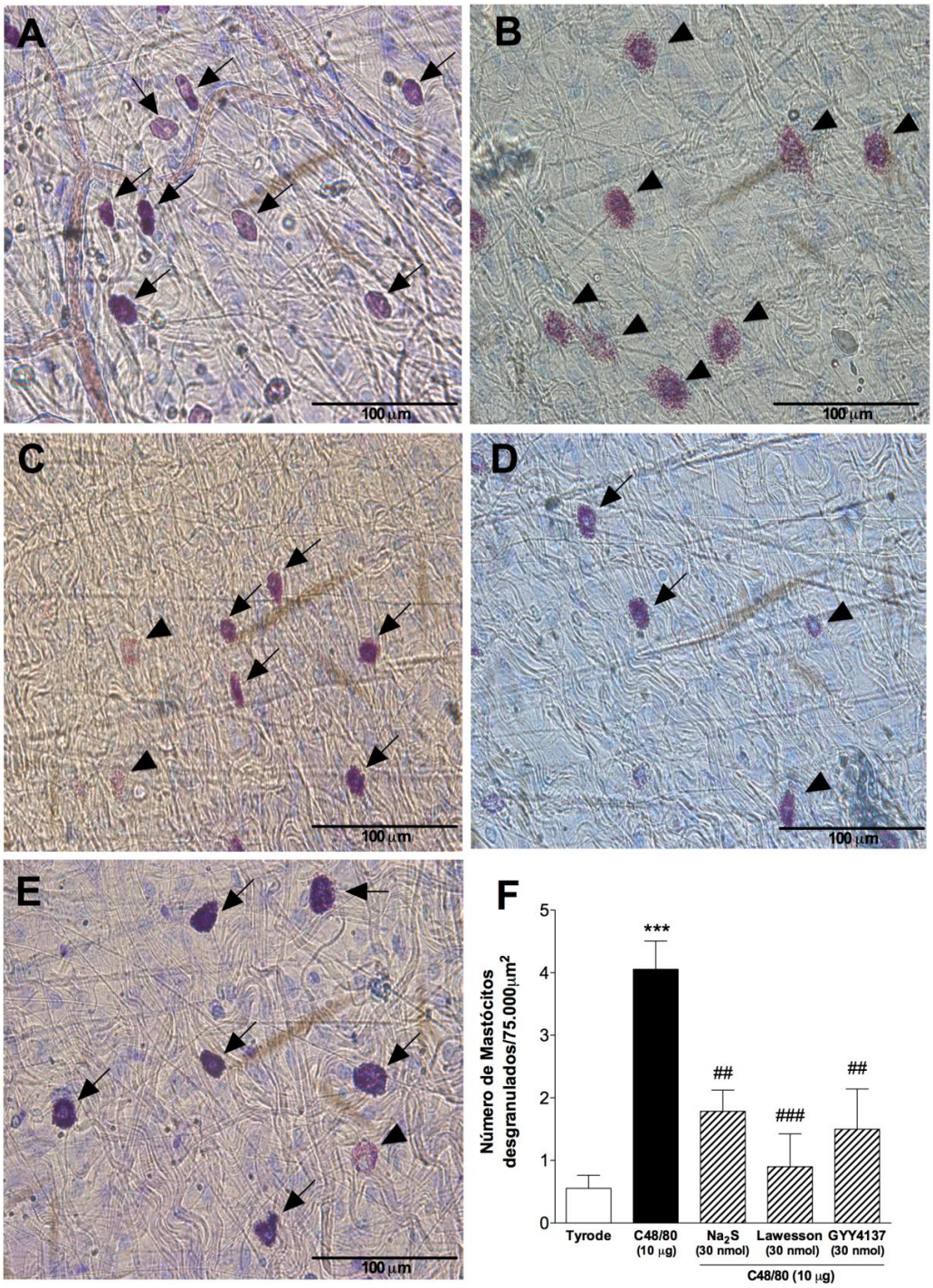

Figura 15 – Efeito dos doadores de H_2S sobre a desgranulação de mastócitos no mesentério de ratos. O mensentério dos animais recebeu a aplicação de Tyrode, C48/80 isolado (10 µg), ou C48/80 previamente a exposição com doadores de H_2S (30 nmol; -2 min). As imagens são representativas dos mesentérios corados com azul de toluidina (1%), expostos ao Tyrode (controle; painel A), C48/80 isolado (painel B) ou C48/80 juntamente com doadores de H_2S: Na_2S, LR e GYY3147 (painéis C, D and E, respectivamente). *Setas* e *cabeças de setas* indicam mastócitos intactos e desgranulados, respectivamente. n=5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. de mastócitos desgranulados por área. ***P<0,05 vs Tyrode. $^{##}$P<0,01 and $^{###}$P<0,001 *vs*. C48/80 isolado (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

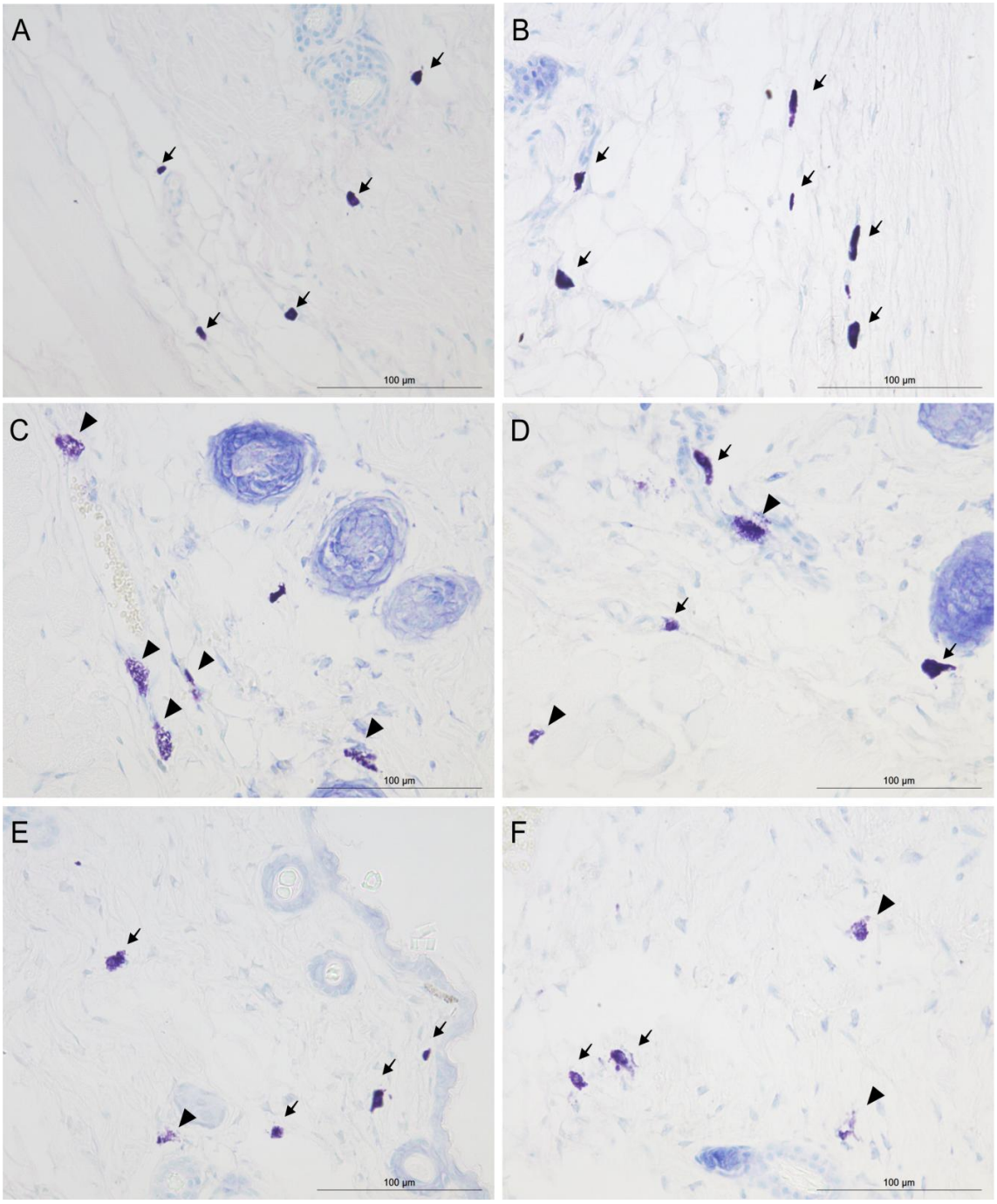

Figura 16 – Efeito dos doadores de H_2S sobre a desgranulação de mastócitos na pele dorsal de camundongos. Fotomicrografias representativas de cortes da pele dorsal (5 µm) corada com azul de toluidina (1%), demonstrando o efeito protetor dos doadores de H_2S na desgranulação de mastócitos induzida por C48/80. Painel A (pele naïve), demonstra as características dos mastócitos intactos (*setas*). Painel B (Tyrode) mostra células intactas sem evidencias de mastócitos desgranulados. Painel C (C48/80 3 µg/sítio, i.d.) ilustra muitos mastócitos desgranulados (*cabeças de setas*). Paineis D, E e F (C48/80 + Na_2S ou LR ou GYY4137 30 nmol, respectivamente) ilustram que a desgranulação de mastócitos induzida por C48/80 é reduzida por doadores de H_2S. n=3.

3.9 Envolvimento dos de K_{ATP} no efeito protetor do H_2S no extravasamento plasmático e no prurido

O mecanismo envolvendo os canais de K_{ATP} sobre o efeito protetor dos doadores de H_2S foi avaliado, via caracterização da glibenclamida, sobre a resposta vasodilatadora induzida pelo agonista desses canais, o pinacidil. O aumento do extravasamento plasmático induzido pela histamina (30 nmol/sítio; n=6) em relação ao Tyrode (Figura 17, painel A) foi potencializado, de forma não dependente da dose, pela co-injeção desta com o pinacidil (10 e 30 nmol/sítio; P<0,001). A injeção i.d. do pinacidil (30 nmol/sítio) *per se* não induz resposta diferente do Tyrode (Figura 17, painel A). O pré-tratamento (-30 min) de animais com a glibenclamida (10 e 30 mg/kg) preveniu marcantemente a potencialização do extravasamento evocado pela co-injeção de pinacidil com histamina (Figura 17, painel A; n=6). O tratamento com a glibenclamida (10 mg/kg, i.p; n=5-6) não afetou de forma significativa o extravasamento plasmático induzido por histamina isoladamente e tampouco reverteu o efeito inibitório do doador de H_2S (Na_2S) sobre o extravasamento plasmático induzido por histamina (Figura 17, painel B). Como esperado, a injeção i.d. de histamina (1 µmol/sítio, n=6; Figura 17, painel C) induz aumento significativo do prurido em relação ao Tyrode. A co-injeção da histamina com o Na_2S (3 nmol/sítio; n=9) inibe o efeito de prurido (P<0.05) evocado por histamina. Em animais pré-tratados com a glibenclamida (10 mg/kg, - 30 min), o efeito protetor do Na_2S sobre o prurido evocado por histamina não é afetado, curiosamente o pré-tratamento com glibenclamida reduziu o prurido evocado pela histamina administrada isoladamente (Figura 17, painel C; n=5-8).

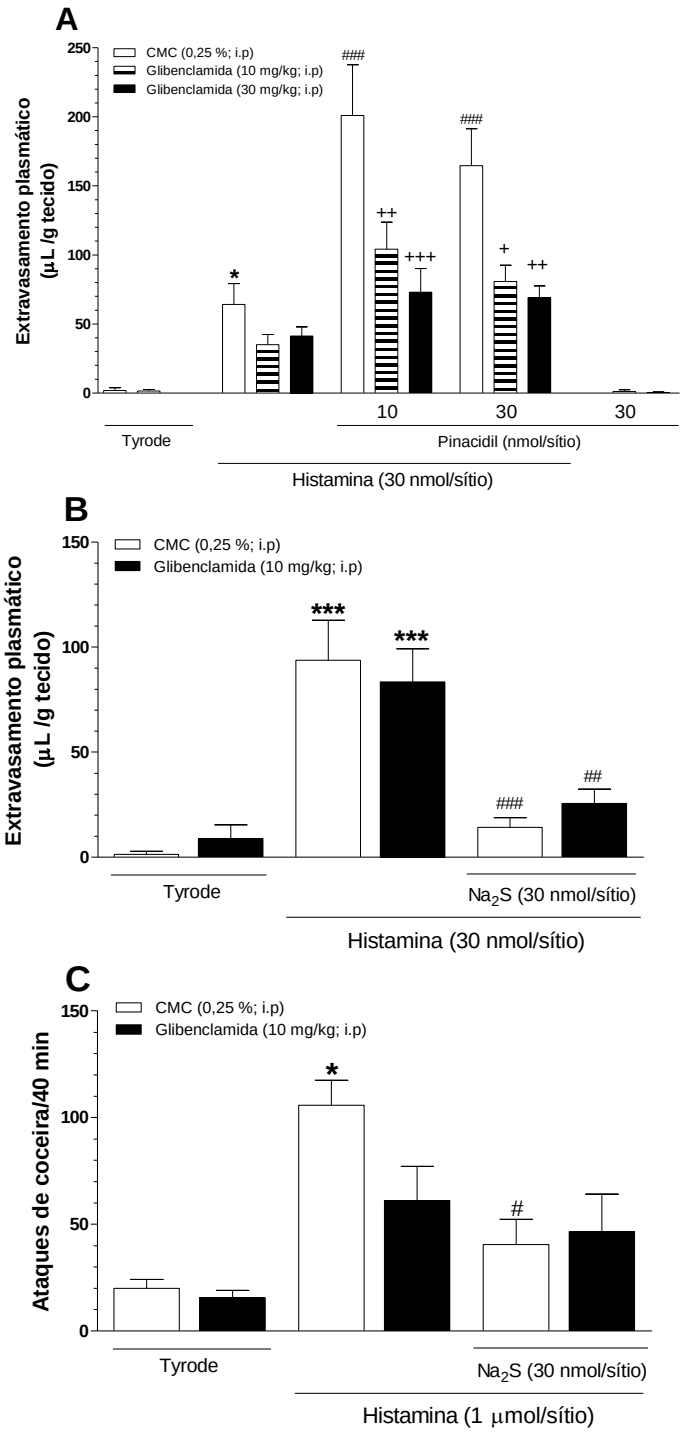

Figura 17 – Bloqueio do canal de K_{ATP} não reverte o efeito protetor do Na_2S sobre o extravasamento plasmático e o prurido induzido por histamina. Painel A ilustra o efeito vasodilatador da co-injeção de pinacidil com histamina em animais pré-tratados (-30 min) com glibenclamida ou veiculo (CMC). Painéis B e C demonstram a ausência de efeito da glibenclamida sobre o efeito protetor do Na_2S no extravasamento plasmático e prurido induzido por histamina, respectivamente. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05-***P<0,001 *vs*. Tyrode + CMC, ### P<0,001 *vs*. histamina + CMC, + P<0,05-+++ P<0.001 *vs*. histamina + pinacidil. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni).

3.10 Padronização da relação dose e tempo-resposta do prurido frente à cloroquina

A injeção i.d. da cloroquina, nas doses crescentes de 50 a 200 µg/sítio (n=5-6), induz aumento significativo, e de forma dose-dependente, no número de ataques de prurido quando comparado ao comportamento obtido no grupo controle (Tyrode; Figura 18, painel A). Na maior dose utilizada da cloroquina (500 µg/sítio; n=5), o comportamento de prurido, representado pela frequência dos ataques de prurido, nos animais foi semelhante ao observado com a dose de 200 µg/sítio, demonstrado pelo platô atingido já com essa dose (Figura 18, painel A).

No período avaliado do comportamento de prurido (40 min), a análise temporal dos resultados demonstra que a cloroquina, na dose de 50 µg/sítio, induz o pico de ataques de prurido nos primeiros 20 min e, logo após, retorna ao valor basal do Tyrode (Figura 18, painel B). O perfil de ataques de prurido frente à dose de 100 µg/sítio foi mais homogêneo, sendo a resposta máxima obtida nos primeiros 10 min, e retornando gradativamente aos níveis basais até os 35 min. Na dose de 200 µg/sítio, o pico de prurido evocado pela cloroquina ocorreu em torno dos 25 min após a injeção. Após esse período, a redução do comportamento de prurido ocorreu gradativamente até atingir o nível basal (Tyrode) aos 40 min. Na maior dose da cloroquina (500 µg/sítio), verifica-se que o comportamento de prurido ocorre de forma tempo-dependente, sendo o pico da resposta observado nos intervalos de 25 e 35 min, mantendo-se constante até o término do registro (40 min; Figura 18, painel B).

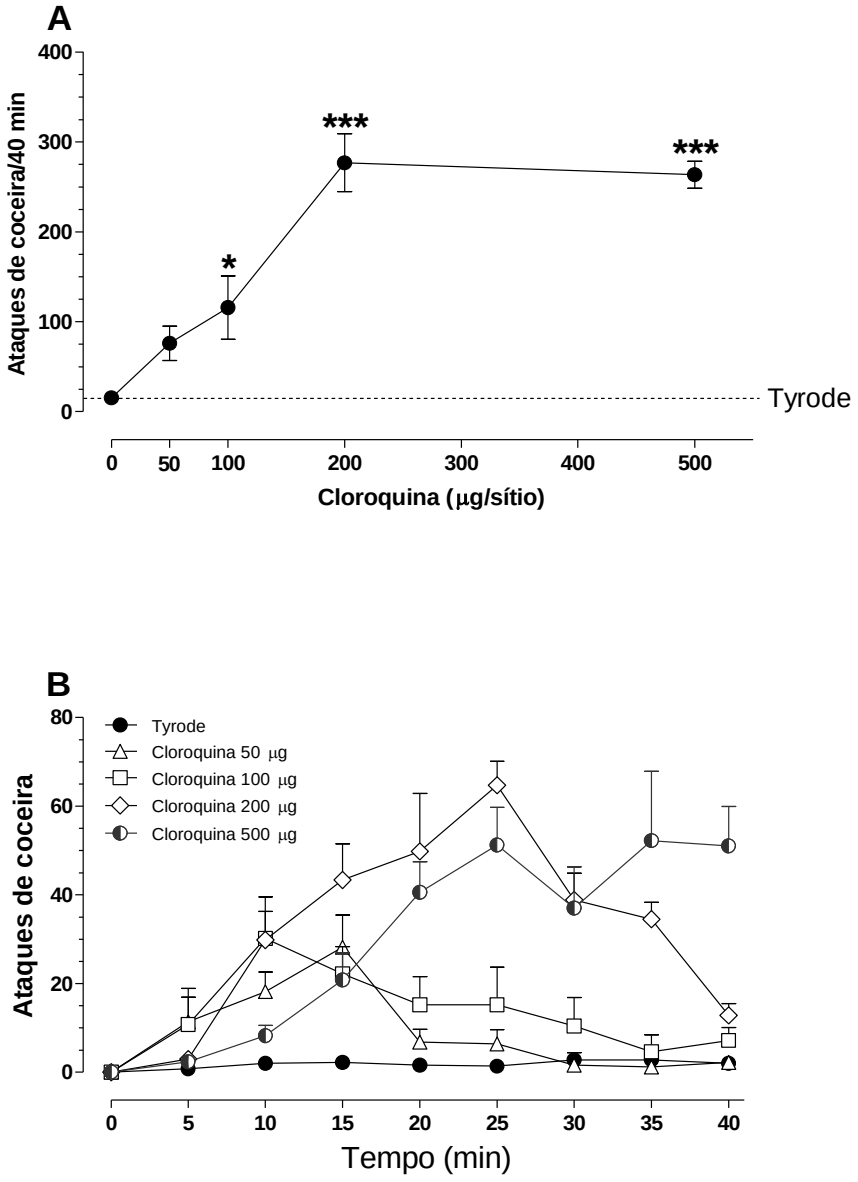

Figura 18 – Relação dose e tempo-resposta da cloroquina na indução do comportamento de prurido em camundongos. O painel A mostra a somatória dos ataques de prurido induzidos pelas diferentes doses de cloroquina no intervalo de 40 min, enquanto o Painel B ilustra a evolução temporal do comportamento de prurido induzido pelas mesmas doses de cloroquina, avaliadas a cada 5 min, durante o intervalo de 40 min. n=5-6. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05-***P<0,001*vs*. Tyrode (controle) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.11 Efeito do tratamento com GYY4137 no prurido induzido por cloroquina

Conforme demonstrado anteriormente, na dose de 100 µg/sítio (n=6), a injeção i.d. de cloroquina aumentou significativamente o número de ataques de prurido em relação ao veículo (Tyrode; Figura 19). A co-injeção com doses crescentes de GYY4137 (0,3-30 nmol/sítio; n=5-6) reduziu o comportamento de prurido, particularmente nas doses de 1 e 30 nmol/sítio (Figura 19). Nas doses de 0,3, 3 e 10 nmol/sitio de GYY4137, o prurido não foi reduzido significativamente (Figura 19).

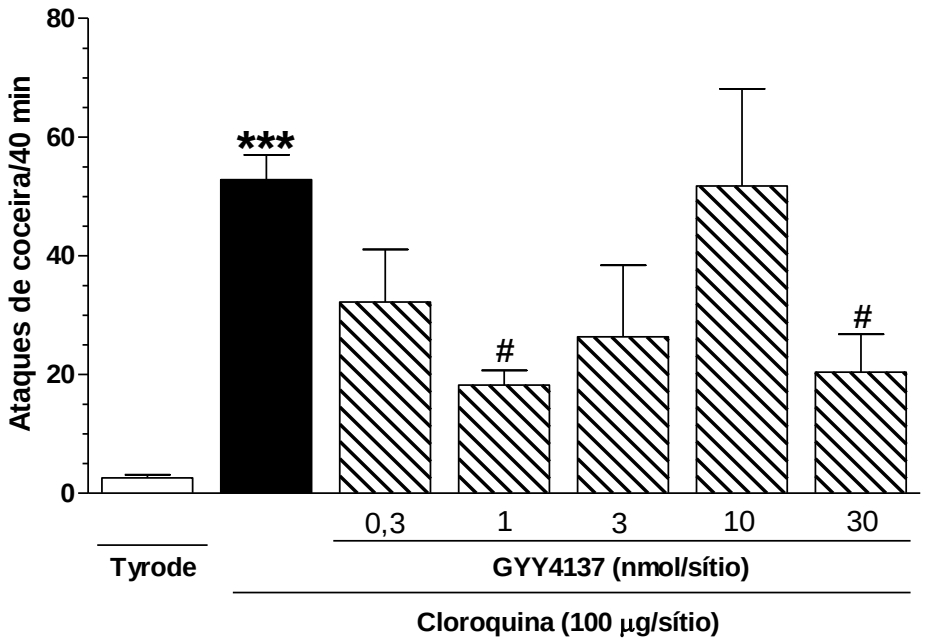

Figura 19 – Efeito do GYY4137 no comportamento de prurido induzido por cloroquina em camundongos. As barras demonstram a média dos ataques de prurido nos animais injetados com cloroquina, na ausência ou presença de doses crescentes do GYY4137 (0,3 – 30 nmol/sítio), n=5-6. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. ***P<0,001 *vs*. Tyrode (controle); $^{\#}$P < 0,01 *vs*. cloroquina isolada (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.12 Caracterização dos sinais clínicos no modelo de psoríase induzida por Imiquimode (IMQ) em camundongos

Os resultados observados na Figura 20 (painéis A e B) demonstram que a aplicação tópica de IMQ na pele dorsal de camundongos Balb C promoveu, a partir do 3º dia do tratamento, aumento do escore dos sinais clínicos inflamatórios (rubor e descamação), o qual foi progressivo até o último dia da análise (6º dia) em relação ao grupo controle. Paralelamente, a atividade da MPO na pele dos animais com a doença, indicativo do infiltrado de neutrófilos, aumentou em relação ao controle ($P<0,001$; Figura 20, painel C, n=6-7).

No 6° dia da indução da psoríase, durante o registro de 30 min, os animais exibiram aumento espontâneo dos ataques de prurido ($P<0,05$; n=7) em relação ao controle (n=6, Figura 20, painel D). Nesse período, o registro temporal dos ataques de prurido, analisado a cada 5 min, revelou um comportamento de prurido uniforme e superior ao do grupo controle (Figura 20, painel E). A diferença no aspecto da pele dorsal pode ser claramente observada no 6º dia (Figura 20, painel F).

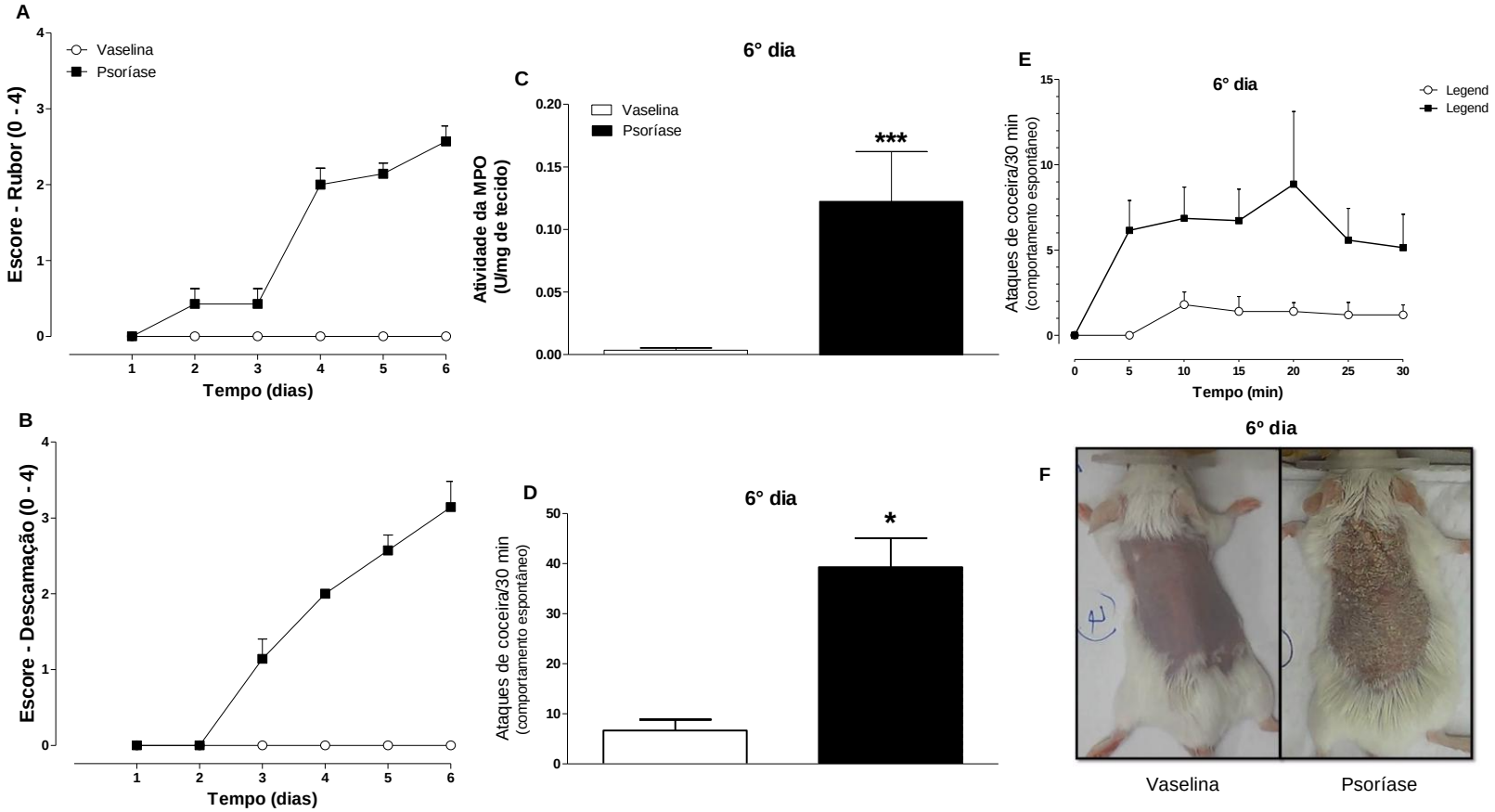

Figura 20 – Caracterização dos sinais clínicos no modelo de psoríase experimental induzida por IMQ. Os Painéis A e B mostram o escore dos sinais clínicos de rubor e descamação da pele, respectivamente, nos grupos controle e submetidos ao tratamento com IMQ. Painel C mostra a atividade da mieloperoxidase (MPO) na pele do grupo controle ou com psoríase no último dia. Os painéis D e E mostram o comportamento espontâneo de prurido no 6º dia durante o período de 30 min. O painel F destaca a aparência da pele dorsal no 6º dia (n=6-7). Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05-***P<0,001 *vs*. controle – vaselina (Teste *t* não pareado).

3.13 Relação dose-efeito do GYY4137 sobre os sinais clínicos na psoríase experimental

Conforme estabelecido previamente, a administração tópica do creme IMQ induz sinais clínicos característicos da psoríase na pele de camundongos, tais como rubor intenso e descamação na pele, os quais foram progressivos durante o período avaliado (Figura 21, painéis A e C, respectivamente). O tratamento concomitante desses animais com o doador de H_2S de liberação lenta, GYY4137, nas diferentes doses utilizadas (25-100 mg/kg; i.p., n=5), reduziu parcialmente o rubor e a descamação da pele destes em relação ao grupo com psoríase não tratado com o doador.

A avaliação do escore clínico (rubor e descamação) no 6º dia de indução da psoríase experimental demonstrou que, o tratamento com GYY4137 reduziu de forma significativa ($P<0,05$–$P<0,001$) o rubor e a descamação da pele dos animais em relação ao grupo com psoríase não tratado (Figura 21, painéis B e D). Todas as doses utilizadas diminuíram o rubor em nível similar, enquanto a redução da descamação apresentou um perfil dose resposta, com ausência de efeito na dose de 25 mg/kg, mas redução significativa ($P<0,05$ e $P<0,01$) nas doses de 50 e 100 mg/kg. Em paralelo, a medida de espessamento na orelha (acantose) foi evidente em animais com a doença em relação ao controle, o tratamento com o GYY4137 reduziu o espessamento da orelha com um perfil dose resposta, este efeito foi similar ao observado na descamação, com ausência de redução significativa na dose de 25 mg/kg, mas redução significativa ($P<0,01$–$P<0,001$) nas maiores doses (50 e 100 mg/kg; Figura 21, painéis E e F).

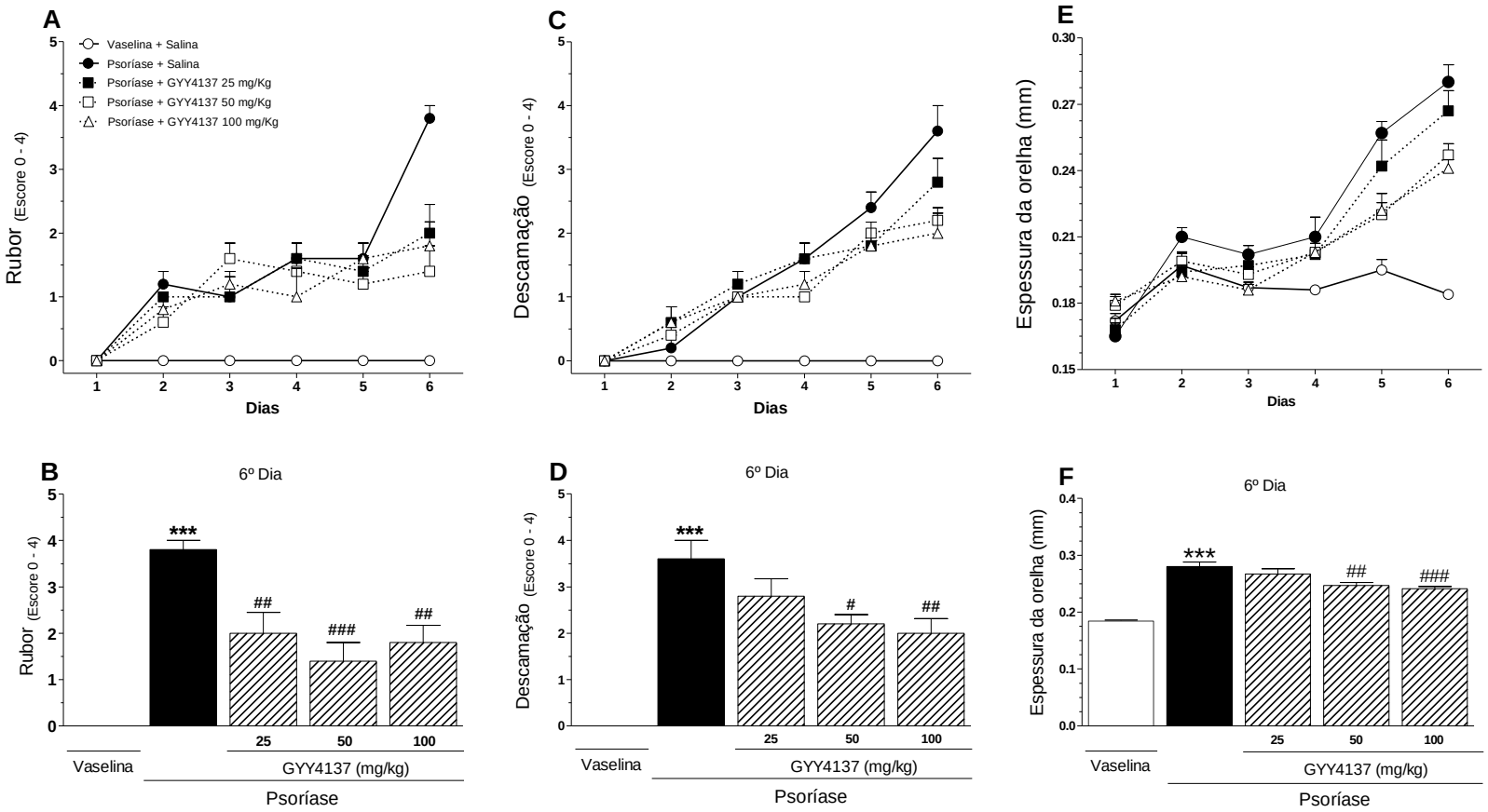

Figura 21 – Efeito do tratamento sistêmico com GYY4137 sobre os sinais da psoríase em camundongos. O PASI foi utilizado como critério de análise. Os painéis A e C ilustram o curso temporal dos escores (PASI) em valores absolutos para o rubor e descamação, enquanto o painel E mostra o curso temporal para o espessamento da orelha (acantose) nos animais dos grupos controle, psoríase e psoríase tratada com doses crescentes de GYY4137 (25 – 100 mg/kg, i.p). Os painéis B, D e F ilustram os registros desses mesmos sinais somente para o último dia (6º dia), n=5. As barras representam a média ± e.p.m. para n animais. ***P<0,001 *vs*. grupo controle (vaselina). # P<0,05- ## P<0,01- ### P<0,001 *vs*. psoríase (na ausência de GYY4137). (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.14 Relação dose-efeito do GYY4137 sobre o prurido espontâneo em animais com psoríase

No 6° dia da indução da psoríase, semelhante ao observado durante o protocolo de padronização (Figura 22, painel D), o grupo com psoríase experimental exibiu aumento significativo no número de ataques de prurido espontâneos, quando comparado aos animais do grupo controle-vaselina (P<0,001; Figura 22; n=5). O tratamento com o GYY4137, na dose intermediária de 50 mg/kg; i.p. (n=5), reduziu significativamente o prurido; todavia, nas doses de 25 e 100 mg/kg; i.p. (n=4-5) do GYY4137, a redução do comportamento de prurido não foi significativa (Figura 22).

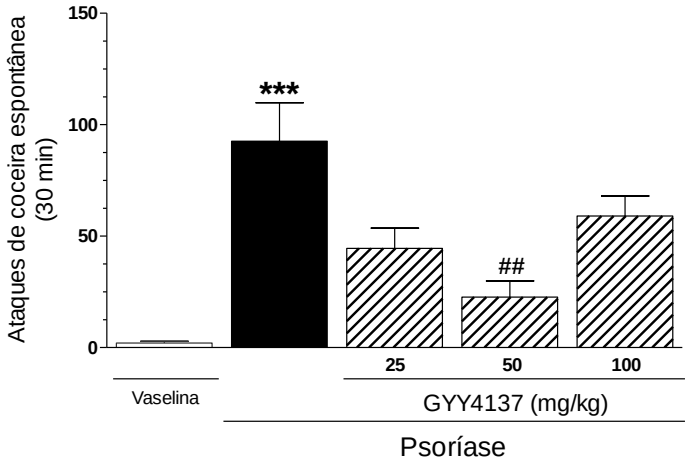

Figura 22 – Efeito do GYY4137 no prurido espontâneo em camundongos com psoríase induzida por IMQ. As barras representam o número de ataques de prurido observados no grupo controle (vaselina) e nos grupos com psoríase na ausência ou presença de doses crescentes de GYY4137 (25 – 100 mg/kg, i.p), n=4-5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. ***P<0,001 *vs*. vaselina (controle); ## P<0,01 *vs*. psoríase (na ausência de GYY4137) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.15 GYY4137 atenua as alterações histopatológicas na pele murina com psoríase

A análise histológica, realizada na pele dorsal dos animais, demonstrou que o grupo controle, ao qual recebeu a administração de vaselina, não apresentou alterações na estrutura da derme ou epiderme (Figura 23, painel A). Em contraste, na pele de animais com psoríase experimental evocada por IMQ, foi possível observar alterações estruturais marcantes, que se assemelham a psoríase humana, tais como espessamento da epiderme (acantose) (Figura 23, painéis B e F), presença de células nucleadas no estrato córneo (paraqueratose), hiperplasia da camada córnea da epiderme (hiperqueratose), presença de cones epidérmicos alongados (cristas interpapilares) e infiltrado neutrofílico (Figura 23, painel B).

Na vigência do tratamento dos animais com psoríase, utilizando diferentes doses de GYY4137, ocorre diminuição significativa da acantose ($P<0,05$–$P<0,01$) com as doses de 50 e 100 mg/Kg. (Figura 23, painéis B–F). A administração de GYY413 também reduziu a paraqueratose, o nível de hiperqueratose e a presença de cones epidérmicos alongados (Figura 23, painéis B-E). O tratamento com GYY4137, com as doses de 50 e 100 mg/kg reduziu significativamente ($P<0,05$) o infiltrado celular (Figura 23, painel B-E), confirmado pela redução na atividade da MPO (Figura 23, painel G).

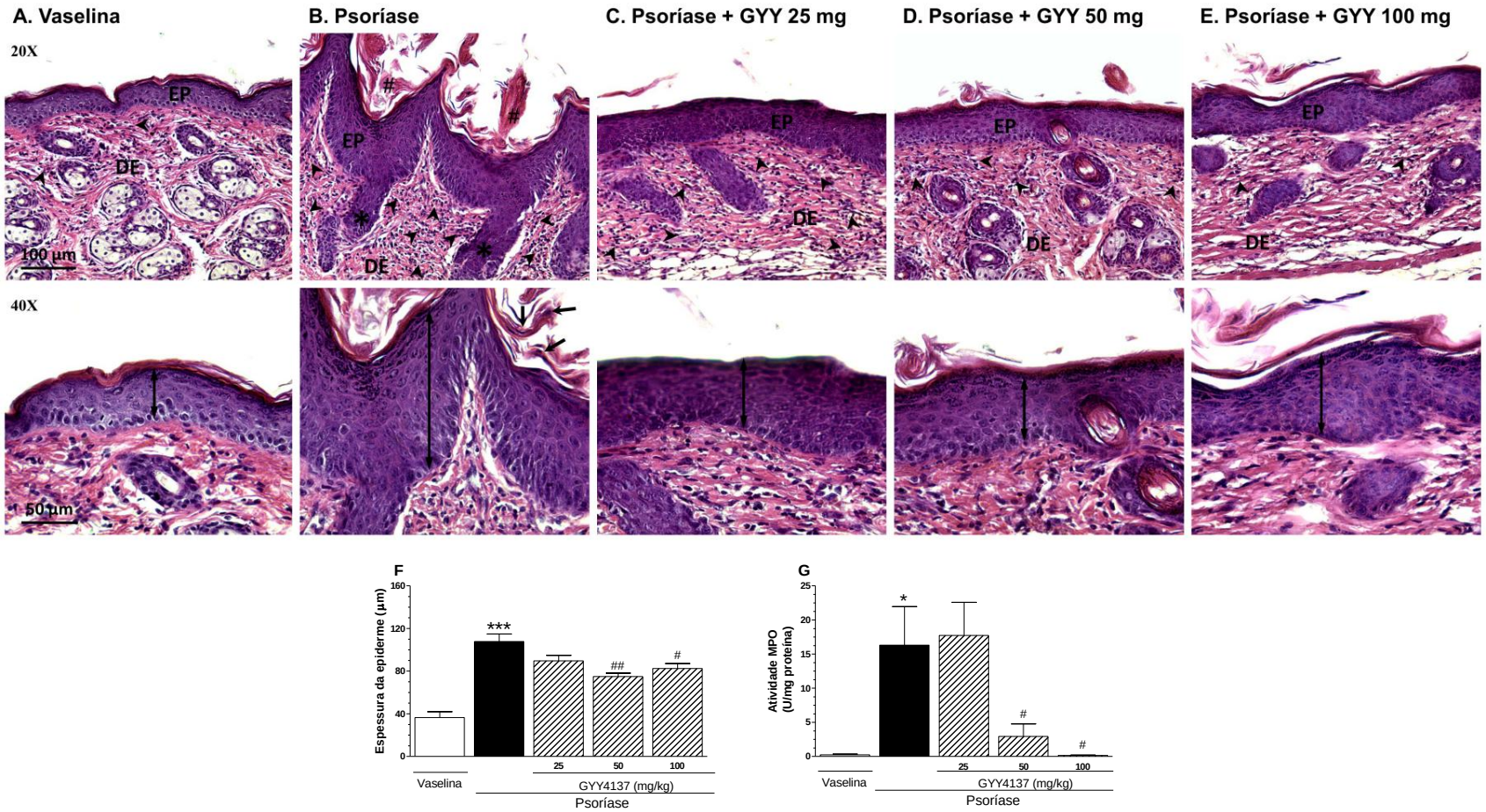

Figura 23 – Efeitos do tratamento sistêmico com GYY4137 na pele dorsal de camundongos com psoríase. Painel A contém fotomicrografias do grupo controle. Painel B demonstra as alterações observadas no grupo psoríase sem tratamento, com destaque para o intenso infiltrado celular (cabeças de seta), espessamento de epiderme (seta com duplo sentido), cones epidérmicos alongados (*), paraqueratose (setas), hiperqueratose (#). Os painéis C a E representam os grupos psoríase tratados com GYY4137 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. O painel F representa a medida da espessura da epiderme em µm, enquanto o painel G demonstra a atividade da MPO, utilizada como indicativo do influxo de neutrófilos. n=5. EP = Epiderme; DE = Derme. Coloração de HE (Hematoxilina & Eosina). Objetivas de 20 e 40x. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05-***P<0,001 *vs*. vaselina (controle); $^{\#}$ P<0,05-$^{\#\#}$P<0,01 *vs*. psoríase (na ausência de GYY4137) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.16 Avaliação dose-resposta do GYY4137 sobre o número de leucócitos totais no sangue e baço de animais com psoríase

No 6º dia da indução da psoríase, o número de leucócitos totais no sangue periférico e baço dos animais com psoríase em relação ao grupo controle (vaselina) mostrou-se marcantemente elevado (P<0,001; Figura 24, painéis A e B). Os animais com psoríase tratados com GYY4137 nas doses de 25 e 100 mg/kg; i.p. apresentaram redução significativa (P<0,05) no número de leucócitos totais no sangue, quando comparado aos animais com psoríase sem tratamento (Figura 24, painel A; n=4-5), efeito similar foi observado com o número de esplenócitos totais, reduzido significativamente (P<0,001) nos animais com psoríase, tratados com a dose de 100 mg/kg; i.p. GYY4137, quando comparado ao grupo com psoríase sem tratamento (Figura 24, painel B; n=5).

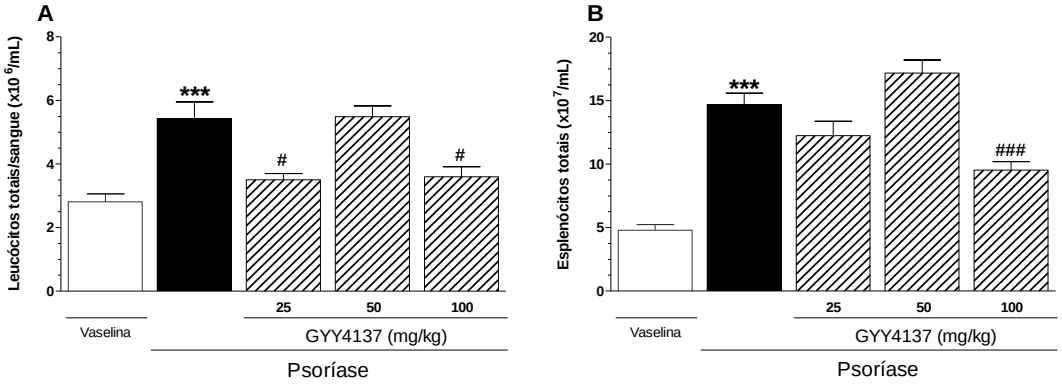

Figura 24 – Efeito do GYY4137 no número de leucócitos totais no baço e sangue periférico de camundongos com psoríase induzida por IMQ. As barras dos painéis A e B mostram o número de células totais no sangue periférico e baço, respectivamente, nos animais dos grupos controle, psoríase e psoríase tratada com doses crescentes de GYY4137 (25–100 mg/kg; i.p), n=4-5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. ***P<0,001 *vs*. vaselina (controle); # P<0,05 - ##P<0,01 *vs*. psoríase (na ausência de GYY4137) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.17 Avaliação dose-resposta do tratamento com o GYY4137 sobre a leucocitose em camundongos com psoríase

Camundongos com psoríase exibiram aumento significativo (P<0,05) no número de neutrófilos, eosinófilos e basófilos no sangue em relação aos valores de celularidade obtidos nos animais controle (vaselina). Não foram detectadas diferenças significativas para o número de linfócitos e monócitos entre os animais com psoríase e controle (n=4-5; Figura 25, painéis A-E).

O tratamento sistêmico com o GYY4137 reduziu significativamente (P<0,05) o número de eosinófilos e basófilos nos animais com psoríase, sendo esse efeito observado para todas as doses testadas do composto (25-100 mg/kg, i.p., Figura 25 painel D). Nenhuma das doses utilizadas de GYY4137 reduziu de forma significativa o número de linfócitos, neutrófilos e monócitos no sangue, em relação ao grupo com psoríase sem tratamento (Figura 25, painéis A-E).

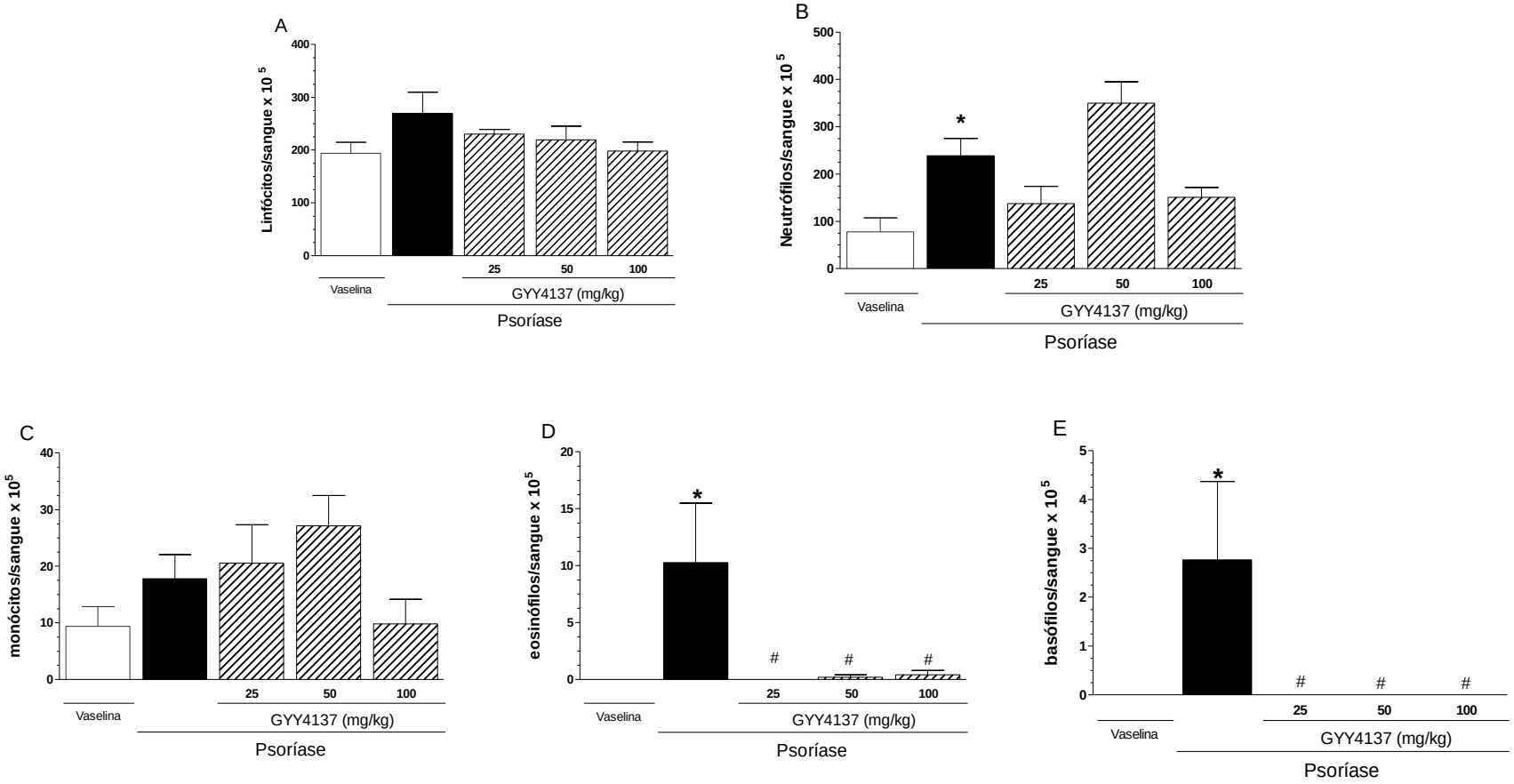

Figura 25 – Efeito do tratamento com GYY4137 sobre os leucócitos circulantes em camundongos com psoríase induzida por IMQ. Linfócitos (painel A), Neutrófilos (painel B), Monócitos (painel C), Eosinófilos (painel D), Basófilos (painel E). As barras o representam o número de diferentes leucócitos no sangue, obtidos de camundongos dos grupos controle, psoríase, e psoríase tratada com doses crescentes de GYY4137 (25–100 mg/kg; i.p), n=4-5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais *P<0,05 *vs*. vaselina (controle); # P<0,05 *vs*. psoríase (na ausência de GYY4137) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnet).

3.18 Efeito do GYY4137 sobre a atividade de enzimas antioxidantes na psoríase experimental

A atividade da TrxR e SOD, na pele dorsal de camundongos dos grupos controle (vaselina) e com psoríase foi similar (Figura 26, painéis A e B). O tratamento de animais com psoríase, utilizando diferentes doses de GYY4137 (25–100 mg/kg; i.p.; n=5), não interferiu na atividade da TrxR e tampouco SOD. Com relação à catalase, houve redução significativa ($P<0,01$) na atividade desta enzima em animais com psoríase, quando comparado ao grupo controle, o tratamento com GYY4137 (100 mg/kg) reverteu este efeito (Figura 26, painel C). A análise das enzimas glutationas em animais com psoríase, demonstrou redução significativa de atividade enzimática da GST ($P<0,001$), mas não em GPx e GR, quando comparado ao grupo controle. Animais com psoríase e submetidos ao tratamento com GYY4137, na maior dose (100 mg/kg; i.p.; n=5), exibiram aumento significativo ($P<0,05$ – $P<0,001$) da atividade das enzimas GR, GPx e GST quando comparado ao grupo psoríase sem tratamento (Figura 26, painéis D–F).

A relação entre os níveis de glutationa oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) demonstrou um aumento de 4,5 vezes da forma GSSG no grupo psoríase, em relação ao grupo controle. O tratamento com diferentes doses de GYY4137 (25–100 mg/kg; i.p.; n=5), diminuiu de forma dose dependente a proporção de GSSG, quando comparado ao grupo psoríase sem tratamento Figura 26, painel G).

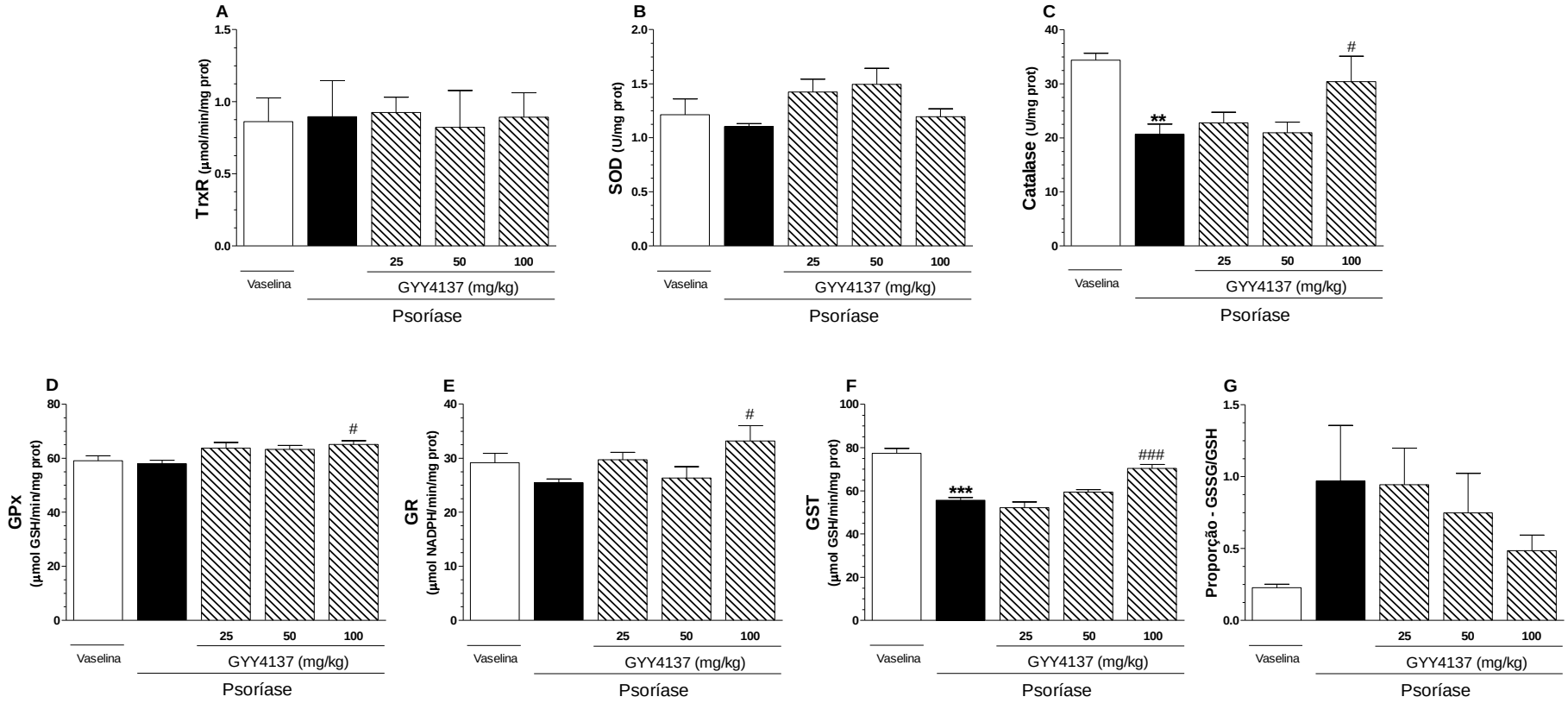

Figura 26 – Efeito do GYY4137 sobre a atividade de enzimas antioxidantes na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ. Atividade das enzimas TrxR (painel A), SOD (painel B), Catalase (painel C), GPx (painel D), GR (painel E) e GST (painel F). Razão entre a proporção de GSSG/GSH (painel G). Análises realizadas em camundongos dos grupos controle, psoríase e psoríase tratada com doses crescentes de GYY4137 (25 – 100 mg/kg, i.p). n=5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. **P<0,01-***P<0,001 *vs*. grupo controle (vaselina). $^{\#}$P<0,05- $^{\#\#\#}$P<0,001 *vs*. Psoríase (na ausência de GYY4137) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnet).

3.19 Relação dose-efeito do GYY4137 sobre a concentração de citocinas na pele dorsal

A indução da psoríase experimental aumentou significativamente ($P<0,05$-$P<0,001$) as concentrações de TNF-α e IL-1β na pele dorsal, em relação ao grupo controle (vaselina), mas não afetou a concentração basal de IL-6, IFN-γ e IL-10 (Figura 27, painéis C-E, n=5)

O tratamento com GYY4137 (50 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente ($P<0,01$) a concentração de TNF-α. A análise das citocinas IL-1β, IL-6, IFN-γ e IL-10 não revelaram alterações significativas na vigência do tratamento com GYY4137 dos animais com psoríase, quando comparado ao grupo psoríase sem tratamento (Figura 27, painéis B-D).

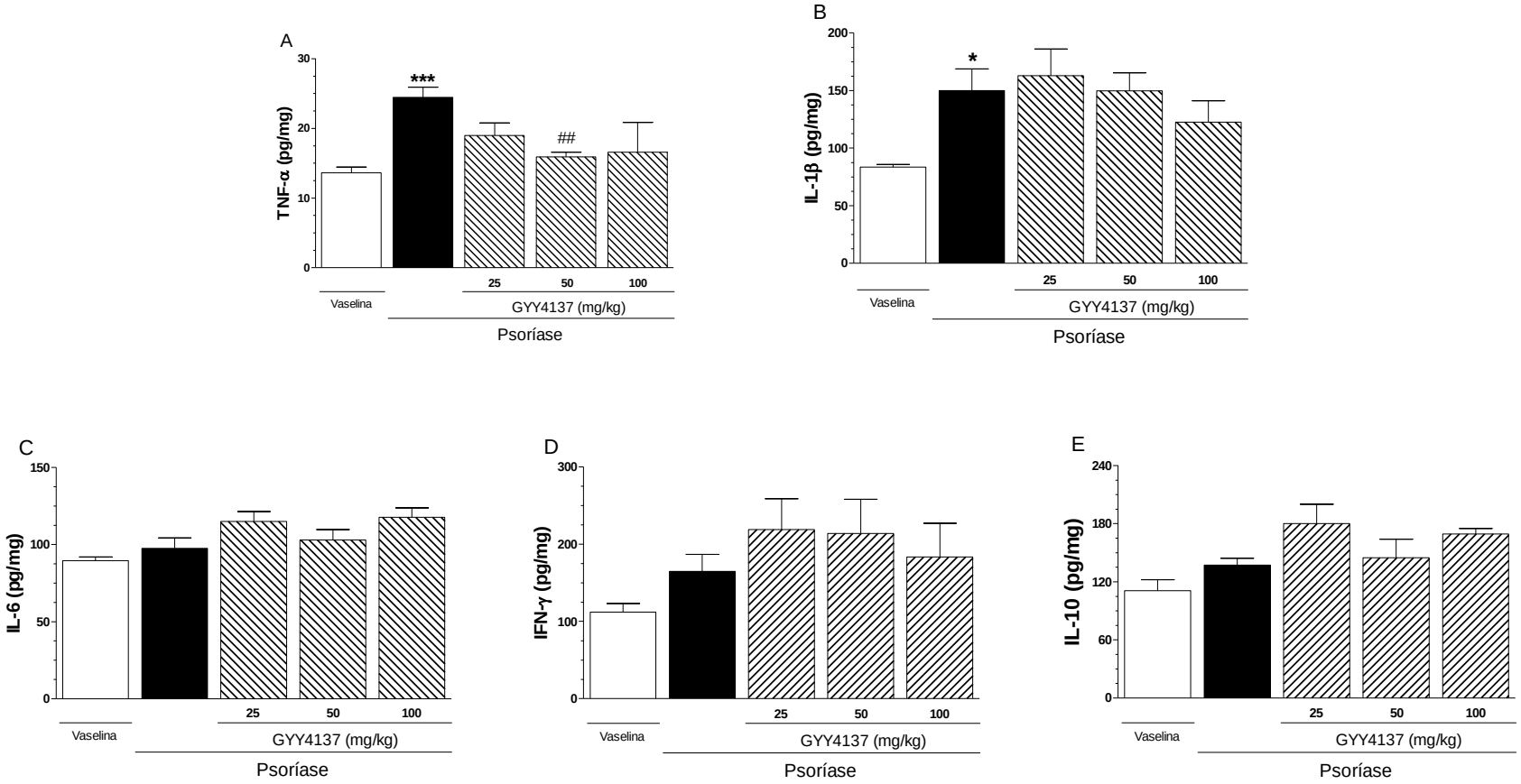

Figura 27 – Efeito do tratamento com GYY4137 sobre a concentração de citocinas na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ. As barras representam as concentrações de TNF-α (painel A), IL-1β (painel B), IL-6 (painel C), IFN-γ (painel D), IL-10 (painel E) na pele dorsal de camundongos do grupo controle, do grupo psoríase e dos grupos com psoríase tratada com doses crescentes de GYY4137 (25–100 mg/kg; i.p), n=5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,01- ***P<0,001 *vs*. vaselina (controle); ## P<0,01 *vs*. psoríase (na ausência de GYY4137) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.20 Avaliação dose-efeito do GYY4137 na ativação do fator de transcrição NF-κB na pele dorsal de camundongos com psoríase

A avaliação da ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB, por meio do ensaio de mobilidade eletroforética (gel shift), demonstrou um aumento de 50 % na translocação do NF-κB (sonda ligada ao fator nuclear), na pele dos animais com psoríase em relação aos controles (Figura 28, n=5), o tratamento da psoríase com GYY4137, na maior dose testada (100 mg/kg, i.p.), reduziu a translocação do fator de transcrição para os valores observados no controle (vaselina). As demais doses de GYY4137 (25 e 50 mg/kg, i.p., n=4-5) não alteraram o nível de translocação observado no grupo psoríase sem tratamento (Figura 28).

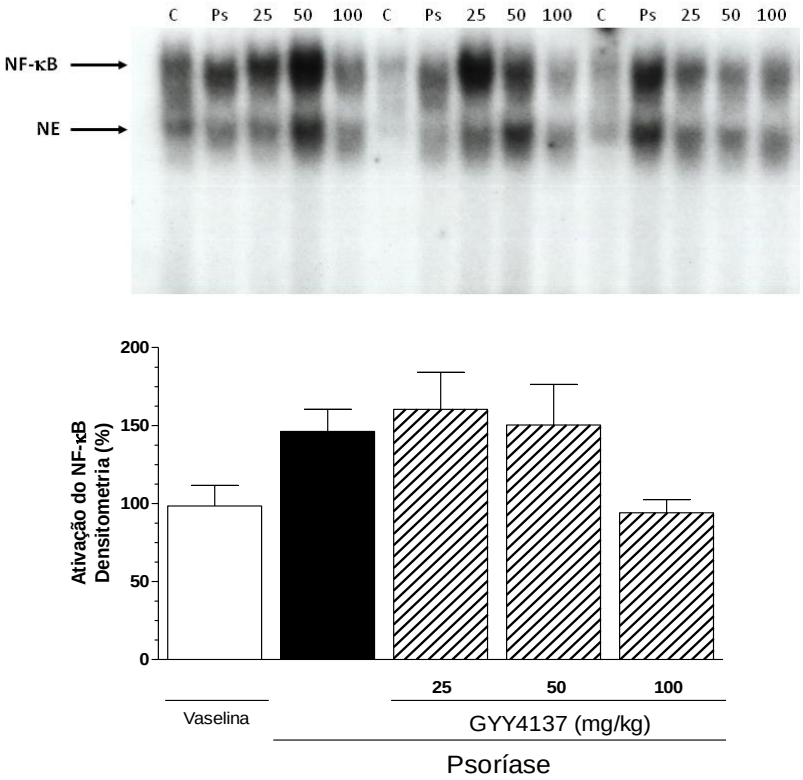

Figura 28 – Efeito do tratamento com GYY4137 sobre a ativação do NF-κB na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ. As barras representam a ativação de NF-κB, expressa em porcentagem, do fator de transcrição na pele dorsal dos animais do grupo controle, do grupo psoríase e dos grupos com psoríase tratada com doses crescentes de GYY4137 (25 –100 mg/kg, i.p), n=4-5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. NE = não específico (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.21 GYY4137 reduz de forma dose-dependente a expressão de caspase-1 na pele dorsal de camundongos com psoríase

Na pele de camundongos com psoríase, a expressão da enzima caspase-1 (p10) aumentou significativamente (≅ 40 %; P<0,05), quando comparado aos camundongos do grupo controle (Figura 29). Nos animais com psoríase tratados com diferentes doses do GYY4137, a expressão de caspase-1 (p10) foi reduzida de forma dose-dependente, mas este efeito foi somente estatisticamente significativo (P<0,05) com a maior dose do GYY4137 (100 mg/kg; Figura 29, n=4-5).

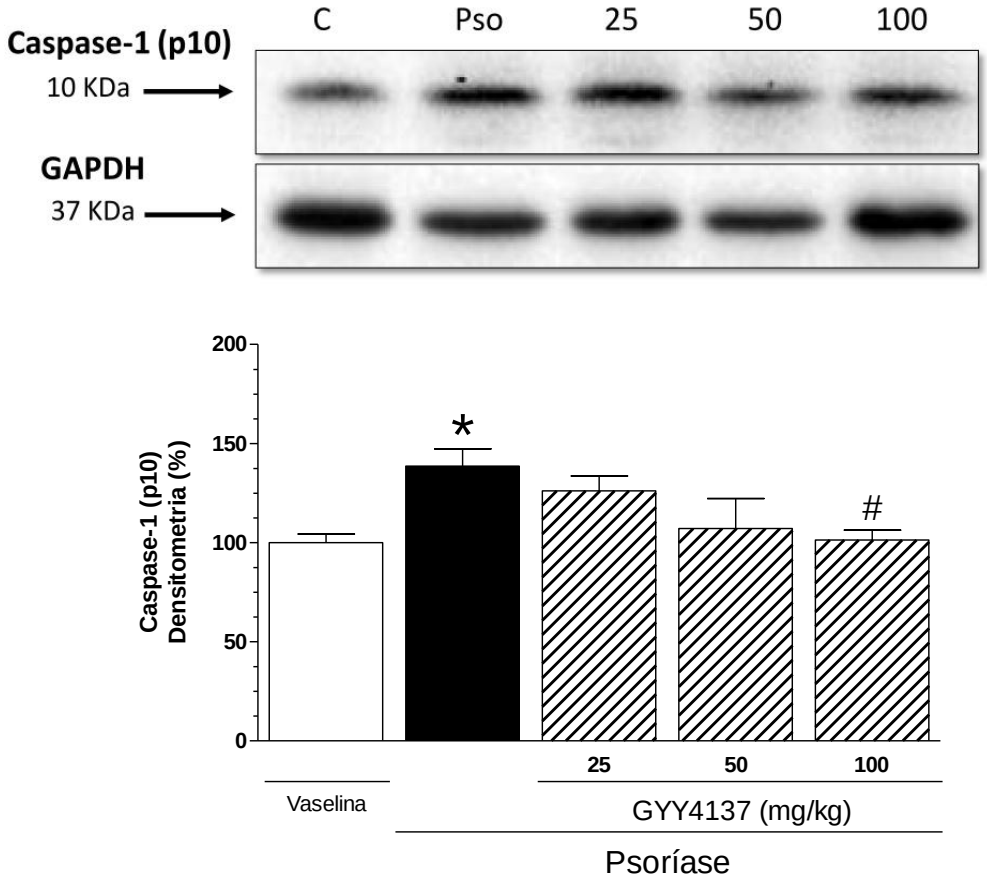

Figura 29 – Avaliação do tratamento com o GYY4137 sobre a expressão de caspase-1 (p10) na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ. As barras representam a porcentagem de expressão de Caspase-1(p10) na pele dorsal de camundongos do grupo controle, do grupo psoríase e dos grupos com psoríase tratada com diferentes doses de GYY4137 (25 –100 mg/kg, i.p), n=4-5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05 *vs*. vaselina (controle); #P<0,05 *vs*. psoríase (na ausência de GYY4137) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.22 Avaliação dose-efeito do GYY4137 na expressão de IL-1β na pele dorsal de camundongos com psoríase

Na pele dorsal dos camundongos com psoríase foi observado um aumento significativo (P<0,01) na expressão de IL-1β, quando comparado aos animais do grupo controle (vaselina). O tratamento sistêmico com GYY4137 (25–100 mg/kg; i.p.; n=4-5), diminuiu a expressão desta citocina, mas somente a maior dose utilizada do GYY4137 (100 mg/kg) reduziu significativamente a expressão de IL-1β nos animais com psoríase (Figura 30).

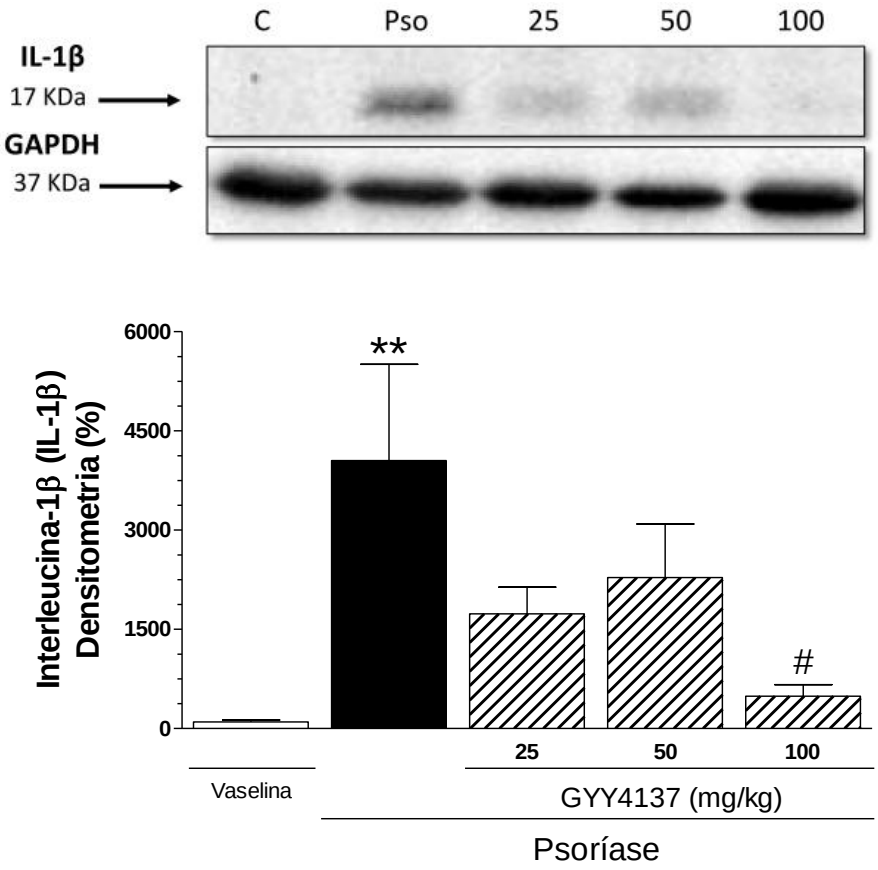

Figura 30 – Avaliação do tratamento com o GYY4137 sobre a expressão de IL-1β na pele dorsal de camundongos com psoríase induzida por IMQ. As barras representam a porcentagem de expressão de IL-1β na pele dorsal de camundongos do grupo controle, do grupo psoríase e dos grupos com psoríase tratada com doses crescentes de GYY4137 (25 –100 mg/kg, i.p), n=4-5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais.**P<0,01 *vs*. vaselina (controle); #P<0,05 *vs*. psoríase (na ausência de GYY4137) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.23 Pele naïve produz H_2S

Inicialmente nos realizamos a padronização deste método em nossas condições experimentais, a análise da produção de H_2S utilizando cérebro, fígado e pele de camundongos naïve demonstrou que todos tecidos testados foram capazes de produzir H_2S (Figura 31, painel A), conforme esperado a menor geração foi observada nas amostras com maior diluição (1000 x), enquanto o aumento da produção de H_2S ocorreu de forma paralela com a redução da diluição dos sobrenadantes, entre os tecidos utilizados as amostras do fígado demonstraram a maior capacidade de geração de H_2S (Figura 31, painel A).

A produção de H_2S também foi avaliada na presença de inibidores das enzimas CBS e CSE, para o teste foi utilizado o sobrenadante das amostras de fígado na diluição de 100x, uma vez que este tecido demonstrou maior capacidade de produção de H_2S. Como demonstrado na Figura 31, painel B, o inibidor das enzimas CBS e CSE (AOAA; 0,0002 – 2 mM) e o inibidor seletivo da enzima CSE (BCA; 0,0002 – 2 mM), reduziram a produção de H_2S de forma concentração dependente, com aproximadamente 95 % de redução na concentração de 1 mM. Outro inibidor, considerado como seletivo da CSE (PAG; 0,0002 – 10 mM) foi menos efetivo, proporcionando 33 % de redução na síntese de H_2S com a maior concentração utilizada (10 mM). Em conjunto, estes dados demonstram a sensibilidade do método para avaliar a produção de H_2S em diferentes condições.

A produção de H_2S na pele dorsal dos camundongos foi mais efetiva a partir da diluição de 30 x, com a produção máxima observada na diluição de 5 x (Figura 31, painel C). Utilizando a diluição de 20 x, foi demonstrado que a produção foi claramente, tempo dependente (Figura 31, painel D).

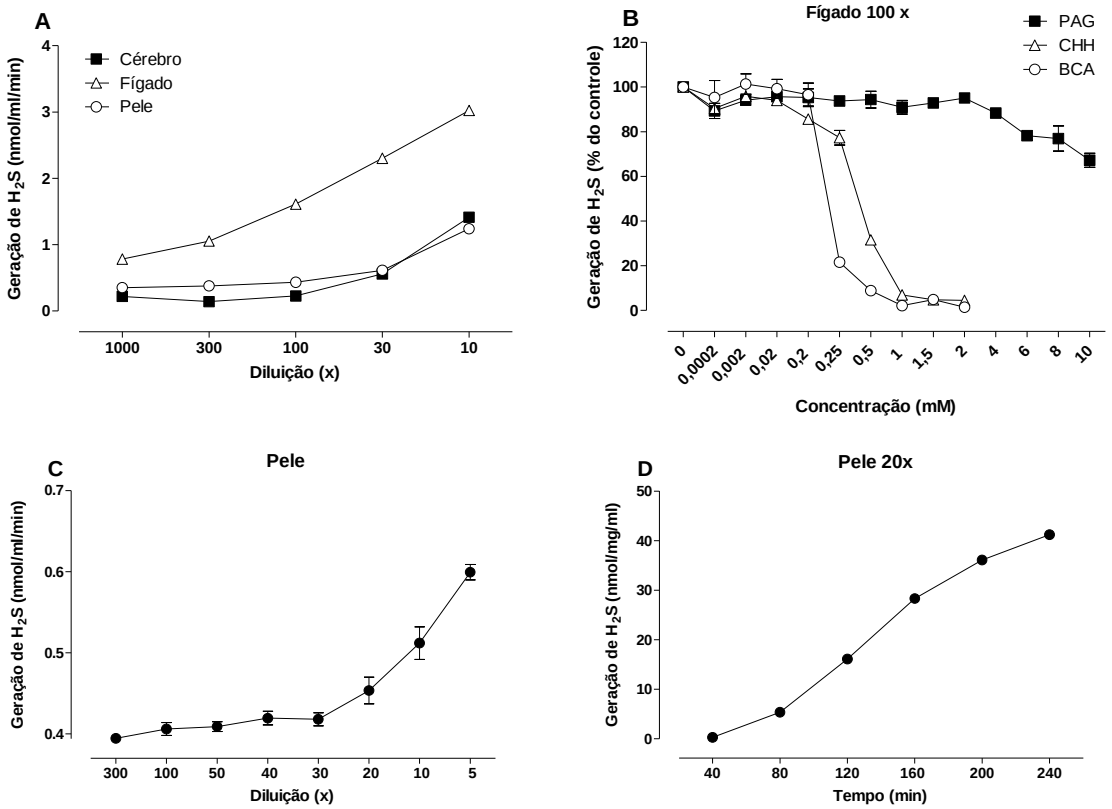

Figura 31 – Avaliação da síntese de H_2S pela formação de sulfeto de chumbo em tecidos de camundongos naïve. Cada reação foi realizada na presença de 10 mM de L-cisteína (substrato) e 2 mM de 5'-fosfato de pirodoxal (co-fator). Geração de H_2S em amostras do cérebro, fígado e pele dorsal sob diferentes diluições (Painel A). Inibição da produção de H_2S no fígado por diferentes inibidores (Painel B). Perfil de geração de H_2S na pele dorsal com variações na diluição do sobrenadante (Painel C) e no tempo de geração (Painel D).

3.24 Redução na produção de H_2S na pele dorsal de animais com psoríase

Após os testes iniciais de padronização, a diluição de 20x e o intervalo de incubação de 150 min foram utilizados, os ensaios de geração de H_2S foram realizados na pele dorsal de camundongos controle (vaselina) e com psoríase.

A indução da psoríase experimental resultou em diminuição significativa (P<0,01) na capacidade de produção de H_2S na pele dorsal, quando comparado ao grupo controle. O mesmo efeito foi observado nas amostras da pele dorsal dos animais com psoríase e tratados com as diferentes doses de GYY4137 (25–100 mg/kg; i.p, n=4), aos quais apresentaram redução significativa (P<0,01) na capacidade de produção de H_2S quando comparado ao grupo controle (vaselina) (Figura 32).

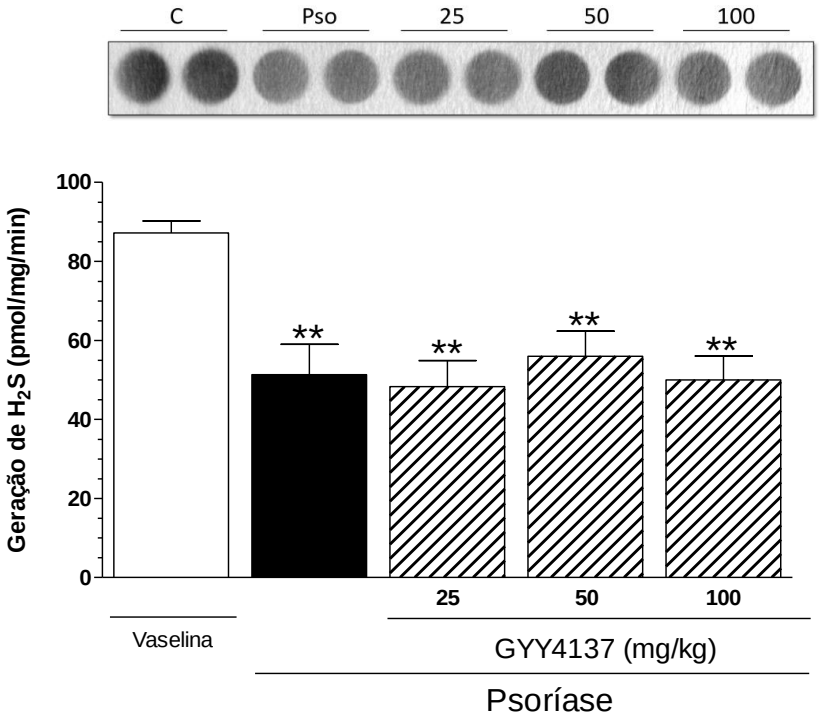

Figura 32 – Efeito da psoríase experimental induzida por IMQ sobre a síntese de H_2S na pele dorsal de camundongos. As barras representam a capacidade de geração de H_2S em amostras da pele dorsal de camundongos do grupo controle, do grupo psoríase e dos grupos com psoríase tratada com doses crescentes de GYY4137 (25–100 mg/kg; i.p,). Todas as reações foram realizadas na presença de 10 mM de L-cisteína (substrato) e 2 mM de 5' fosfato de pirodoxal (co-fator), n=4. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. **P<0,001 *vs*. vaselina (controle) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.25 A expressão de enzimas geradoras de H_2S é reduzida na pele murina com psoríase

A avaliação do nível de expressão das enzimas sintetizadoras de H_2S, CSE e CBS foi realizada na pele dorsal dos camundongos dos diferentes grupos. A expressão da enzima CSE não foi alterada significativamente entre os grupos controle e psoríase e, tampouco foi observada alterações nos grupos com psoríase que receberam o tratamento com diferentes doses de GYY4137 (Figura 33, painel A). De forma contrária ao que ocorre com a CSE, a expressão da enzima CBS foi reduzida significativamente ($P< 0,05$) em todos os animais com psoríase em comparação com o grupo controle. Este efeito foi similar entre todos os grupos com psoríase, não tratados e sob o tratamento com GYY4137 (Figura 33, painel B).

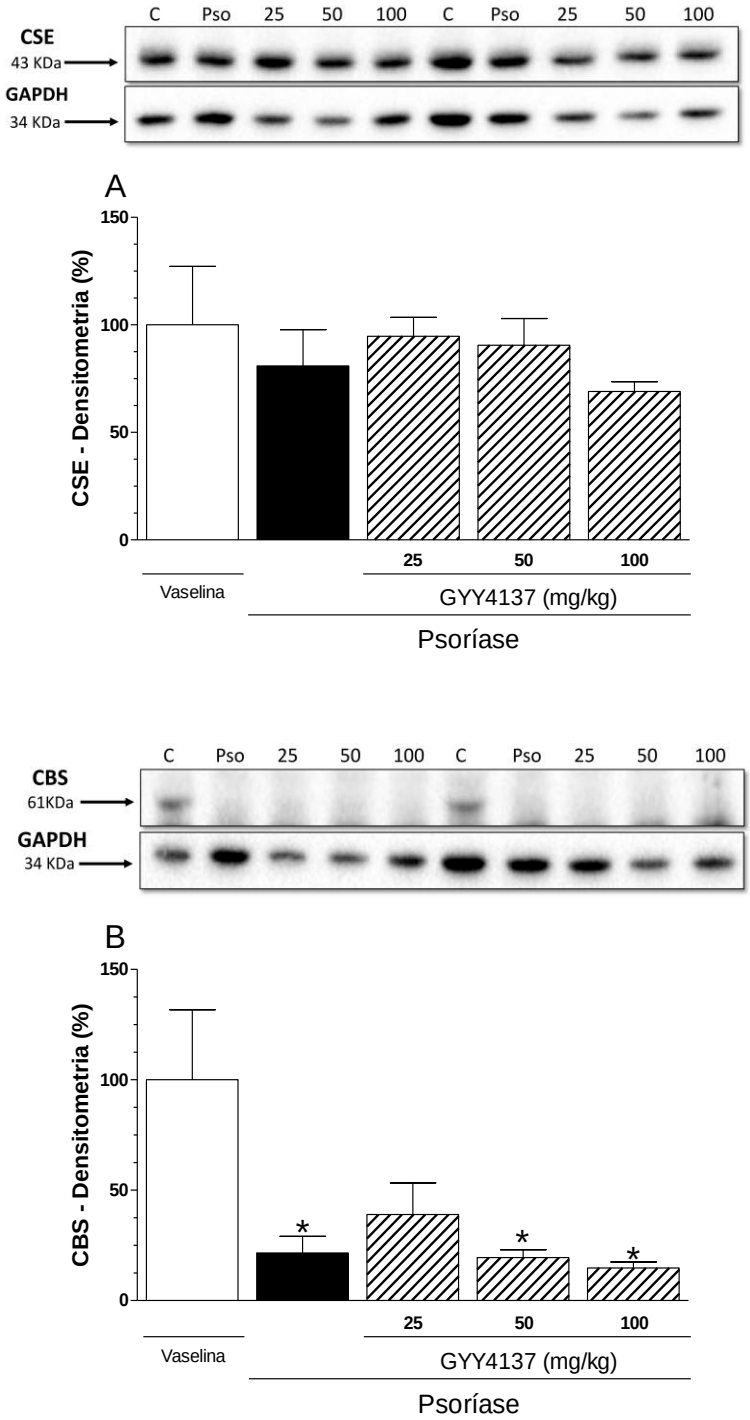

Figura 33 – Avaliação da psoríase experimental induzida por IMQ sobre a expressão de enzimas geradoras de H_2S na pele dorsal de camundongos. As barras representam a porcentagem de expressão de CSE (Painel A) e CBS (Painel B) na pele dorsal dos animais do grupo controle, do grupo psoríase e dos grupos com psoríase tratada com diferentes doses de GYY4137 (25–100 mg/kg, i.p), n=5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. *P<0,05 *vs*. vaselina (controle) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

3.26 O bloqueio da síntese de H_2S não agrava os escores (PASI) da psoríase

A indução da psoríase por IMQ em camundongos, juntamente com a administração diária do inibidor da enzima CSE, β-ciano-L-alanina (BCA, 50 mg/kg, i.p., n=5), não alterou significativamente a progressão da doença, quando comparado ao grupo de animais (n=5) doentes e tratados com a administração diária de salina (i.p).

A análise temporal do rubor, descamação e espessamento da pele, em ambos os grupos, demonstrou evolução similar no desenvolvimento de cada característica (Figura 34, painéis A, C e E). Similarmente, a avaliação do ultimo dia (6° dia) de análise, não revelou diferenças significativas entre os grupos, para os escores de rubor, descamação e espessamento da pele (Figura 34, painéis B, D e F), ou para o número de ataques de prurido (Figura 34, painéis G, H).

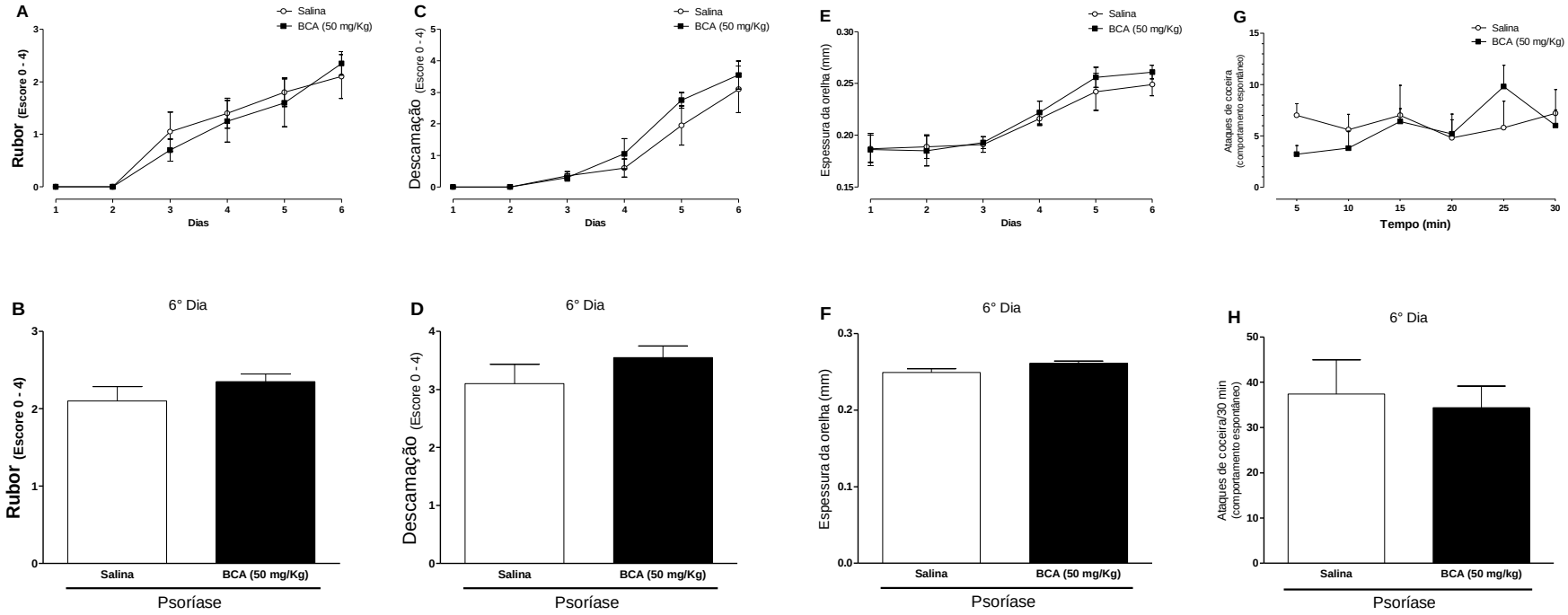

Figura 34 – Efeito da inibição da enzima CSE sobre o desenvolvimento da psoríase experimental induzida por IMQ. Camundongos foram tratados diariamente com inibidor da síntese de H_2S (BCA, 50 mg/kg, i.p) ou salina. A psoríase experimental induzida por IMQ foi realizada em ambos os grupos. Rubor (painéis A e B), descamação (painéis C e D), espessamento da pele da orelha (painéis E e F), análise do número de ataques de prurido (painéis G e H), n=5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. (Teste-T de Student).

3.27 O bloqueio da síntese endógena de H_2S não interfere na celularidade e esplenomegalia no modelo de psoríase

No ultimo dia (6º dia) de análise da psoríase, o aumento no número de leucócitos totais no sangue e baço dos animais com psoríase induzida por IMQ, não diferiu significativamente entre os grupos tratados sistemicamente (i.p.) com o BCA 50 mg/kg ou salina (Figura 35, painéis A e B). O mesmo ocorreu com o desenvolvimento do baço, que permaneceu similar entre os dois grupos (Figura 35, painel C).

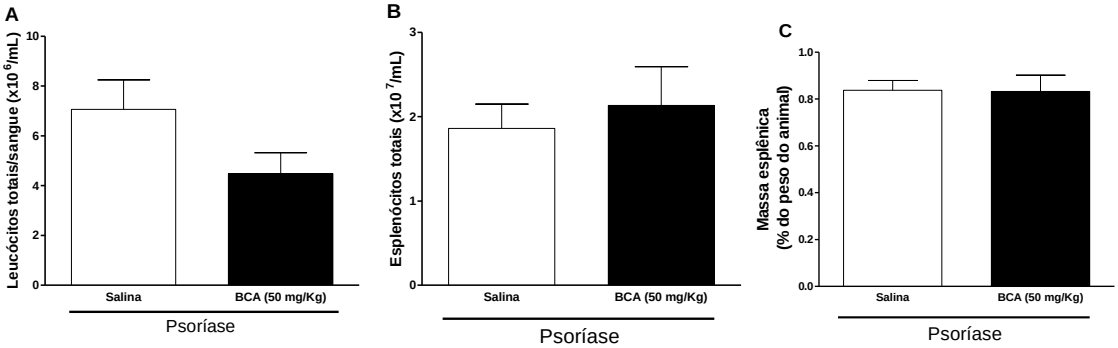

Figura 35 – Efeito da inibição da síntese endógena de H_2S sobre a contagem de células totais no sangue periférico e alterações no baço dos animais com psoríase induzida por IMQ. Camundongos foram tratados diariamente com inibidor da síntese de H_2S (BCA, 50 mg/kg, i.p) ou salina. A psoríase experimental induzida por IMQ foi realizada em ambos os grupos. Número de células totais no sangue (painel A), número de esplenócitos (painel B) e massa esplênica (painel C), n=5. Os dados estão apresentados como média ± e.p.m. para n animais. (Teste-T de Student).

4 DISCUSSÃO

Achados prévios do grupo (Rodrigues et al., 2013), demonstraram que a injeção i.d. simultânea com os doadores de H_2S de liberação rápida, reduzem de forma significativa, porém nem sempre dependente da dose, o prurido agudo e o extravasamento plasmático induzido por histamina ou pelo composto desgranulador de mastócitos C48/80.

Ao contrário dos resultados obtidos com os doadores de H_2S de liberação rápida, dados do atual estudo, demonstram que o doador de H_2S de liberação lenta, GYY4137, reduziu o prurido induzido por histamina, mas não aquele promovido por C48/80 e tampouco o extravasamento plasmático provocado por ambos, histamina e C48/80 (Rodrigues et al., 2017). Por outro lado, o influxo de neutrófilos provocado pela injeção i.d. do C48/80 foi substancialmente reduzido por GYY4137.

As diferenças nas respostas, entre os doadores de H_2S de liberação rápida e lenta, podem estar relacionadas com variações na quantidade de H_2S, liberada por cada tipo de doador. Foi observado na resposta do GYY4137 frente ao C48/80, em que provavelmente a quantidade de H_2S liberada por este doador seja muito reduzida para inibir respostas rápidas, como o prurido e o extravasamento plasmático (avaliado entre 30-40 min após a indução), ao passo que eventos com maior tempo de resposta como o influxo de neutrófilos (avaliado 4 horas após a indução), permitam a liberação de quantidades adequadas de H_2S para exercer efeitos inibidores. Estudo de Li et al. (2009) vem de encontro a esta hipótese, pois demonstram que em modelo de sepsis induzida por LPS em ratos, a concentração de marcadores inflamatórios (ex.: IL-6, NOx) no plasma dos animais foi reduzida, de forma tempo dependente, via tratamento com o GYY4137. Isto sugere que baixas doses de doadores de H_2S de liberação rápida (Na_2S, LR, etc.), podem ser preferíveis aos doadores de liberação lenta (GYY4137), para reduzir o prurido e a inflamação cutânea em uma condição aguda.

Os mastócitos possuem diferentes mediadores inflamatórios e pruritogênicos além da histamina (Moon et al., 2014), possivelmente contribuindo para o menor efeito do GYY4137 sobre as respostas induzidas por C48/80. Adicionalmente, diversos fatores, incluindo características físico-químicas, determinando índices de solubilidade, captação e compartimentalização celular, taxa de liberação e disponibilidade de H_2S podem diferir entre os compostos doadores.

Relativo ao prurido induzido por C48/80 é importante salientar que foi

demonstrado que este composto ativa diretamente uma nova classe de receptores (Mas-related G protein-coupled receptors – Mrgprs) presentes em mastócitos (McNeil et al., 2015). Os transdutores de sinais desta família de receptores também são encontrados em fibras sensoriais que desencadeiam a sensação de coceira (Liu et al., 2011; Wilson et al., 2011). Esta via sugere que o C48/80 é capaz de induzir prurido de forma direta, por meio da ativação de fibras sensoriais específicas e também de forma indireta, estimulando a liberação de mediadores dos mastócitos. A ação direta do C48/80 sobre as fibras sensoriais pode constituir um mecanismo auxiliar na indução do prurido por esta molécula.

De forma contrária aos dados obtidos neste estudo, resultados de outros autores (Wang et al., 2015), demonstraram que a injeção i.d. de doadores de H_2S de liberação rápida (NaHS ou Na_2S), nas faixas de concentração entre 7–280 mM e 2–67 mM, respectivamente, foram capazes de induzir comportamento de prurido em camundongos, em um mecanismo envolvendo a ativação dos canais de cálcio do tipo T dependente de voltagem 3.2 ($Ca_v3.2$). Entretanto, resultados publicados anteriormente por Elies et al. (2014), demonstraram que o NaHS em baixas concentrações (µM), inibe a ativação de células HEK293 superexpressando os canais $Ca_v3.2$ e, o resíduo extracelular de histidina na posição H191, presente neste canais, foi identificado como crucial para este efeito. Curiosamente, quando estes autores utilizaram cultura de neurônios dos gânglios da raiz dorsal (DRG), testando diferentes concentrações de NaHS, as menores concentrações (µM), também inibiram a ativação destas células, enquanto as maiores (mM) provocaram o efeito oposto. A ativação destas células por altas concentrações de NaHS, foi relacionada com o aumento da concentração de Na^+ livre na solução de perfusão, o que resultou na ativação de canais de Na^+ dependentes de voltagem (Elies et al., 2014). Em linha com estes resultados, nós especulamos que a presença de Na^+ em altas concentrações, constitua um artefato experimental que possa explicar as diferenças, entre os nossos resultados e aqueles apresentados pelo estudo de Wang e colaboradores (Wang et al., 2015), uma vez que a concentração das soluções contendo os doadores de H_2S, foram muito maiores no estudo conduzido por estes autores, quando comparado ao utilizado no presente trabalho. Um modelo para avaliar o efeito dos doadores de H_2S sobre a ativação de neurônios sensoriais sensíveis à histamina, considerando o papel dos canais $Ca_v3.2$ neste contexto, deve ser avaliado no futuro, como alternativa para explicar o efeito benéfico dos doadores de H_2S no controle do prurido agudo.

O extravasamento plasmático provocado por histamina é desencadeado principalmente pela ativação de receptores H_1, em menor extensão por receptores H_2 expressos nos vasos presentes na pele de roedores (Belcheva, Zhelyazkova, 1988; Jin et al., 2006) e humanos (Marks e Greaves 1977; Grossmann et al., 1999). A injeção i.d. dos doadores de H_2S, Na_2S ou LR, nas doses entre 0,3–10 nmol/sítio, reduziram significativamente o prurido e o extravasamento plasmático induzido por histamina, mesmo não apresentando um perfil de resposta dependente de dose. Ao invés disso, demonstraram um padrão bifásico no comportamento de prurido e no extravasamento plasmático, observado com estes doadores, em particular com Na_2S (Rodrigues et al., 2017).

A histamina exerce seus efeitos inflamatórios, em parte através da geração de NO (Jin et al., 2006), uma vez que o bloqueio da oxido nítrico sintase (NOS) inibiu significativamente o extravasamento plasmático induzido por histamina em vias aéreas de humanos (Dear et al., 1996). De maneira similar ao que ocorre com histamina, C48/80 também induz intenso comportamento de coceira e inflamação na pele, caracterizada por extravasamento plasmático e influxo de neutrófilos. A resposta mais pronunciada observada com o C48/80, pode ser relacionada à exocitose de diversos mediadores (histamina, 5-HT, etc.) pré-formados nos mastócitos, aos quais agem em receptores presentes nos vasos sanguíneos e neurônios (Marks, Greaves 1977; Saria et al., 1984; Jiang et al., 2000).

Considerando que o prurido e o extravasamento plasmático induzido por C48/80, foram significativamente reduzidos, pela co-injeção com doador de liberação rápida, Na_2S e LR (Rodrigues et al., 2017), mas que o mesmo efeito não foi observado no extravasamento plasmático induzido por histamina ou C48/80 quando co-injetados com GYY4137, é possível sugerir, que a quantidade de H_2S disponibilizada pelo GYY4137 na microsvasculatura, durante as fases iniciais da resposta vascular, não seja suficiente para interagir com NO e inibir sua ação potencializadora sobre a permeabilidade vascular. De fato, é bem estabelecido que o extravasamento plasmático inicia-se rapidamente após a injeção i.d de mediadores tais como histamina, enquanto que o influxo de neutrófilos ocorre posteriormente (>3h). Nos estágios iniciais do processo inflamatório, o influxo de neutrófilos é extremamente acentuado (Serhan et al., 2007). Neste sentido, nossos resultados demonstram que 4 horas após a injeção i.d. de C48/80, ocorreu um marcante influxo de neutrófilos (mensurado pela atividade da MPO), que foi significativamente reduzido pelos doadores de liberação rápida e por

GYY4137. Assim, é possível que no intervalo de 4 horas, a quantidade de H_2S liberada por GYY4137 foi suficiente para reduzir o influxo de neutrófilos em resposta ao C48/80.

Nós também demonstramos que a inibição da síntese endógena de H_2S, maximizou o prurido e o influxo de neutrófilos induzidos por C48/80. Além disso, a administração de Tyrode, nos animais com inibição da síntese de H_2S desencadeou comportamento de prurido e influxo de neutrófilos. Estes resultados indicam que a produção endógena de H_2S possui um papel relevante para o controle do prurido e inflamação. É importante destacar que o estudo conduzido por Zanardo et al. (2006) foi o primeiro a demonstrar por meio de microscopia intravital, que diferentes doadores de H_2S de liberação rápida (Na_2S, NaHS e LR) reduziram significativamente a adesão e o influxo de leucócitos induzidos por carregenina. Ainda, utilizando um modelo de air pouch em roedores, o estudo também destacou que a produção endógena de H_2S funciona como um importante modulador da inflamação aguda, uma vez que os animais que receberam inibidores da biossíntese de H_2S exibiram aumento na aderência e influxo de leucócitos. Resultados similares foram obtidos em modelos de sinovite induzida por carragenina (Ekundi et al., 2010, 2013) e injuria gástrica provocada por ácido acetilsalicílico (Fiorucci et al., 2005). Redução na expressão de moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, LFA-1, P-selectina e E-selectina constituem um importante mecanismo para a inibição do influxo de leucócitos mediada por doadores de H_2S (Fiorucci et al., 2005; Zanardo et al., 2006; Sidhapuriwala et al., 2009; Guan et al., 2013).

Adicionalmente, nós fornecemos a primeira evidencia que demonstra a produção de H_2S na pele dorsal de camundongos. Tal geração na pele foi similar ao encontrado no cérebro, mas em menor proporção ao observado no fígado (Rodrigues et al., 2017). A análise da produção endógena de H_2S, em resposta ao C48/80, demonstrou que houve aumento na capacidade de produção, 30 min após a injeção i.d, mas não após 4 horas. Considerando os dados obtidos sobre a inibição endógena de H_2S, é possível sugerir que o aumento inicial na síntese deste gás em resposta a desgranulação de mastócitos seja uma tentativa do hospedeiro em controlar a resposta inflamatória.

Considerando a hipótese de um efeito estabilizante, sobre a desgranulação de mastócitos, ser um mecanismo importante no efeito protetor dos doadores de H_2S sobre a coceira e a inflamação cutânea (extravasamento plasmático e influxo de neutrófilos), induzida por C48/80, foram realizados experimentos *in vivo* e *in vitro*. Utilizando

mastócitos isolados do peritônio de ratos e estimulados com C48/80 *in vitro*, nós observamos que Na_2S e LR reduziram significativamente a quantidade de histamina liberada, o que não foi observado com GYY4137. Corroborando com os dados *in vitro*, em uma abordagem *in vivo* utilizando microscopia intravital para estudar os efeitos exógenos do H_2S na integridade dos mastócitos, demonstrou-se que além dos doadores de H_2S de liberação rápida, o GYY4137 também reduziu significativamente o índice de desgranulação dos mastócitos no mesentério de ratos. Similarmente, a análise dos mastócitos presentes na pele dorsal de camundongos ilustra que Na_2S ou LR e em menor extensão o GYY4137, reduzem a desgranulação em camundongos injetados i.d. com C48/80. Em conjunto, estes dados indicam que o H_2S é capaz de inibir a liberação de histamina dos mastócitos e que este efeito parece estar relacionado com a quantidade de H_2S liberada por cada tipo de doador. Com relação às diferenças observadas entre os dados *in vitro* e *in vivo*, obtidos com o doador de liberação lenta GYY4137 sobre a estabilidade dos mastócitos, é importante mencionar que variáveis como biotransformação estão presentes nos estudos in vivo. Por exemplo, altas concentrações de H_2S induzem apoptose em células epiteliais intestinais *in vitro* (Guan et al., 2013), enquanto que o tratamento sistêmico de ratos, utilizando altas doses de doadores de H_2S, não induziu efeitos colaterais significativos (Wang, 2012).

É consenso que o H_2S vem ganhando terreno como um importante mediador para o controle da inflamação e nocicepção, além da sua relevância no sistema cardiovascular. Os mecanismos envolvidos na sinalização dos efeitos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos desse gás ainda são controversos. Um dos mecanismos propostos envolve a ativação ou bloqueio de canais iônicos, incluindo os canais de K^+ regulados por ATP (K_{ATP}). Procurou-se aqui, identificar, como demonstrado em outros estudos (Distrutti et al., 2006; Zanardo et al., 2006; Cunha et al., 2008), se os canais de K_{ATP} participam do mecanismo envolvido no efeito protetor dos doadores de H_2S sobre o prurido, bem como a inflamação cutânea associada.

A ativação dos canais de K_{ATP} pelo H_2S ocorre via mecanismo de S-sulfidração, um processo que envolve a conversão de grupos tióis (-SH) da cisteína para persulfetos (-SSH), uma vez que esse canal possui subunidades que formam o poro de condução para o canal de K^+ (Kir6.x) e subunidades do receptor de sulfoniluréia (SUR). Tais subunidades formam pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína na porção extracelular, que podem ser rompidas por H_2S, e, assim, induzir mudanças na conformação da subunidade SUR e, consequentemente, a abertura do canal de K_{ATP}

(Mustafa et al., 2009; Jiang et al., 2010).

De posse do conhecimento das doses empregadas em estudos publicados na literatura, bem como em estudos prévios de curvas dose-resposta do nosso laboratório para o ativador pinacidil (Takano et al., 2004) e do bloqueador dos canais de K_{ATP}, glibenclamida (Costa et al., 1996; Dal-Secco et al., 2008; Mizokami et al., 2012), foi realizado experimentos co-injetando esses fármacos com histamina. Primariamente, neste estudo a co-injeção de doses crescentes de pinacidil (10 e 30 nmol/sítio) com a histamina induziu potencialização da permeabilidade vascular e subsequente extravasamento plasmático, quando comparado ao efeito dessa amina injetada isoladamente. Apesar de potente, o extravasamento obtido frente à co-injeção do pinacidil e histamina não ocorreu de forma dependente da dose. É provável que o pinacidil, (10 nmol/sítio) já na menor dose utilizada, promova resposta vasodilatadora máxima na microcirculação cutânea dos animais.

Paralelamente, demonstrou-se que o pré-tratamento i.p. dos animais com doses distintas (10 e 30 mg/kg; i.p.) da glibenclamida aboliu a potencialização do extravasamento plasmático induzido por ambas as doses do pinacidil co-injetadas com histamina. Estes resultados indicam que a ação agonista desse agente em canais de K_{ATP} foi bloqueada pela glibenclamida; todavia, o mesmo tratamento não modificou a resposta do pinacidil administrado isoladamente. Vale ressaltar que o pinacidil *per se* não induz extravasamento plasmático significativo em relação ao Tyrode, confirmando que este agente promove vasodilatação, mas não aumenta a permeabilidade microvascular (extravasamento plasmático).

Ali et al. (2006) demonstraram que a administração de baixas doses de doadores de H_2S inibiu o efeito vasorelaxante de doadores de NO, bem como da acetilcolina e histamina, sendo esse efeito não afetado pela glibenclamida. Todavia, os mesmos autores observaram que altas concentrações do NaHS (> 200 µM) promovem *per se* relaxamento em anéis isolados de aorta, o qual é reduzido pela glibenclamida (Ali et al., 2006). Tais resultados sugerem que a interação do H_2S com o NO tanto *in vivo* quanto in *vitro* culmina na formação de moléculas com nenhuma ou pouca ação vasorelaxante (ex.: nitrosotióis). Sabendo que a histamina exerce seu efeito inflamatório via, em parte, por meio de sua ação vasodilatadora em receptores $H_{1,}$ localizados nas células endoteliais da microcirculação que, consequentemente, leva à geração de NO local (Jin et al., 2006), é possível que a co-injeção do doador de H_2S (Na_2S) com a histamina atenuaria o processo inflamatório local promovido por essa amina, o que de fato

ocorreu. Entretanto, ao contrário dos demais estudos (Distrutti et al., 2006; Zanardo et al., 2006; Cunha et al., 2008), o pré-tratamento dos animais com a glibenclamida não reverteu o efeito protetor inibitório do Na_2S sobre o prurido ou inflamação evocada por histamina.

Apesar desses dados contrastantes, vale ressaltar que dados da literatura demostram a participação dos canais de K_{ATP} em mecanismos de excitabilidade neuronal (Liss, Roeper, 2001). Enquanto o bloqueio dos canais de K_{ATP} pela glibenclamida exacerbou a nocicepção (alodinia mecânica) no modelo de neuropatia (câncer), o agonista desses canais (pinacidil) promoveu efeito inverso, inibindo a alodinia, provavelmente pela hiperpolarização de fibras sensorias, induzidas pela abertura dos canais de $K_{ATP.}$ (Xia et al., 2014).

Sabe-se que as vias neurais de condução para a dor e prurido relacionam-se entre si. Enquanto os opióides possuem como um dos efeitos adversos, o prurido, a sensação de dor resultante do ato de coçar-se freneticamente, pode antagonizar a sensação de coceira (Davidson, Giesler, 2010). Partindo do conhecimento que o bloqueio dos canais de K_{ATP} está relacionado ao aumento da resposta nociceptiva, é plausível sugerir, com base na teoria acima, que esse bloqueio possa resultar na redução do comportamento de prurido nos animais injetados com histamina, uma vez que o aumento da transmissão nociceptiva pode antagonizar a sensação de prurido (Ikoma et al., 2006; Kremer et al., 2014). De fato, o pré-tratamento com glibenclamida, reduziu o comportamento de coceira induzido por histamina nestes camundongos. Tais resultados levam à conclusão que, o mecanismo de ação inibitório do H_2S, sobre o extravasamento plasmático promovido pela histamina, não é regulado via canais de K_{ATP}. Entretanto o papel deste canal, no efeito inibitório do H_2S sobre o prurido provocado por histamina ainda é incerto. Recentemente, outros resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa (Coavoy-Sánchez et al., 2016), demonstraram que doadores de H_2S, de liberação rápida e lenta, diminuíram o comportamento de prurido em um mecanismo dependente de canais de K_{ATP}. A discrepância nos resultados obtidos entre ambos os estudos, pode estar relacionada com as diferenças na via de administração da glibenclamida, sistêmica (Rodrigues et al., 2017) *vs* local (Coavoy-Sánchez et al., 2016).

Em outra etapa deste estudo, a fim de investigar o efeito anti-pruritogênico do H_2S sobre o prurido desencadeado de forma independente da histamina, verificou-se o efeito farmacológico do GYY4137 na coceira induzida por cloroquina, um fármaco utilizado terapeuticamente para o tratamento da malária, mas cujo efeito adverso

frequente é o prurido. Postula-se que essa sensação de coceira induzida pela cloroquina, é decorrente da ativação de receptores da família MRGPR, subtipo MRGPRA3, presentes em fibras sensoriais do tipo C (Liu et al., 2009; Akiyama, Carstens, 2013). Assim como demonstrado em diversos estudos (Imamachi et al., 2009; Liu et al., 2010; Wilson et al., 2011), a administração i.d. de cloroquina, promoveu aumento significativo do comportamento de coceira em camundongos, quando comparado aos animais controle. Quanto ao emprego farmacológico do GYY4137 no controle da coceira induzida por cloroquina, foi interessante observar que o H_2S promoveu diminuição significativa da coceira nas doses de 1 e 30 nmol/sítio. Embora um perfil de redução dependente de dose não seja claramente observado, estes dados demonstram que o aumento da concentração de H_2S é capaz de reduzir o prurido, tanto em vias dependentes quanto independentes de histamina. De fato, demonstramos que os doadores de H_2S de liberação rápida e lenta diminuíram o comportamento de coceira, induzido por SLIGRL-NH2 (Coavoy-Sánchez et al., 2016), um ativador de receptores PAR_2 (al-Ani et al., 1995). Recentemente foi demonstrado que SLIGRL-NH2, também é capaz de ativar os receptores da família MRGPR (Liu et al., 2011). Considerando que os doadores de H_2S reduziram o prurido induzido por cloroquina e por SLIGRL-NH2, é possível sugerir que os receptores da família MRGPR sejam potenciais alvos para os efeitos do H_2S.

Em continuidade ao estudo, buscou-se analisar o efeito do H_2S em um modelo crônico, que permitisse ampliar a compreensão dos aspectos sensoriais e inflamatórios, analisados agudamente nos experimentos anteriores. Atualmente, o modelo de psoríase experimental induzido por IMQ em camundongos, introduzido originalmente por van der Fits et al. (2009), é considerado uma abordagem interessante para o estudo de moléculas com potencial terapêutico, bem como para melhor compreensão da fisiopatologia da psoríase.

Em comum com os aspectos clínicos da psoríase em placa observada em humanos, diversos estudos demonstraram que a aplicação de IMQ em camundongos promoveu rubor intenso, descamação da epiderme, espessamento da pele, infiltrado de leucócitos e alterações histopatológicas (Tortola et al., 2012; Baek et al., 2012; Sun et al., 2013; Byamba et al., 2014; Johansen et al., 2015; Chen et al., 2017; Dou et al., 2017). Vale ressaltar que o nosso grupo demonstrou pela primeira vez, que além dos sinais clínicos da doença, o modelo com IMQ promoveu prurido espontâneo (Rodrigues et al., 2015), reforçando assim a semelhança do modelo animal com a psoríase em

humanos. Estudos de Sakai et al. (2016) e Takahashi et al. (2017) corroboraram os nossos achados do prurido no modelo com o IMQ.

Estabelecido o modelo da psoríase induzido por IMQ, procedeu-se à investigação de mecanismos envolvidos e a relevância do H_2S, cuja participação em doenças inflamatórias e mecanismos sensitivos (dor e prurido) tem sido demonstrado por nosso grupo e por outros (Distrutti et al., 2006; Ekundi-Valentim et al., 2010, 2013; Benetti et al., 2013; Schmidt, 2016; Rodrigues et al., 2017)

Neste estudo, o potencial efeito protetor do H_2S na progressão e desenvolvimento da psoríase experimental, e prurido relacionado foi demonstrado por meio do tratamento farmacológico com o doador de liberação lenta, o GYY4137. O tratamento sistêmico diário dos animais com doses crescentes (i.p.) do GYY4137 atenuou significativamente o curso temporal do escore PASI (rubor, descamação, espessamento), sendo a resposta máxima da inibição mais evidente no último dia, onde também foi mensurada uma inibição significativa do prurido crônico. Em conjunto estes dados apontaram para uma melhora significativa na condição dos animais que receberam a suplementação exógena de H_2S por meio do GYY4137.

Neste modelo de psoríase um destaque deve ser dado para as alterações histopatológicas típicas da doença que incluem a presença de infiltrado celular intenso, acantose, paraqueratose, hiperqueratose e cristas interpapilares. O tratamento com o GYY4137, principalmente nas maiores doses testadas, reduziu todos esses parâmetros histológicos analisados, confirmando a importância do H_2S. Diante desse conhecimento, um estudo ainda não publicado do grupo, confirmou que o GYY4137 incorporado a uma nanodispersão e aplicado topicamente, reduziu significativamente os sinais/sintomas da doença, representando uma potencial estratégia para o tratamento da psoríase (Schmidt, 2016).

De forma interessante, a balneoterapia nas águas do mar morto (rico em compostos sulfurados) foi relacionada com a redução na intensidade da psoríase em diversos pacientes (Matz et al., 2003). Segundo sugestão de Johansen et al. (2005), a redução nas lesões psoriáticas destes pacientes durante a balneoterapia está associada à menor expressão das formas fosforiladas de p38 e ERK1/2. Reforçando esses dados, foi demonstrado que o NaHS, reduziu a proliferação e a adesão de queratinócitos humanos em cultura, via mecanismo dependente da redução da expressão das integrinas β4, α2 e α6, além de diminuição da pERK 1/2. O tratamento das lesões na pele de pacientes com psoríase, utilizando uma solução de NaHS promoveu inibição substancial das lesões,

assim como reduziu a expressão de pERK 1/2 (Gobbi et al., 2009).

Coletivamente, os dados apresentados pelos estudos descritos acima, indicam que o aumento da concentração endógena de H_2S, pode estar relacionado com a redução na expressão de integrinas, assim como reduz o grau de fosforilação e ativação de p38 e ERK1/2. Estas vias de sinalização podem ser importantes participantes nos efeitos farmacológicos produzido pelo GYY4137 em nosso modelo de psoríase, análises adicionais devem ser realizadas em estudos futuros do nosso grupo.

Ainda, é importante salientar que este estudo demonstrou que doadores de H_2S são capazes de reduzir o prurido agudo, densencadeado por diferentes mediadores, possívelmente agindo diretamente sobre as fibras sensoriais, mas também por inibir a desgranulação de mastócitos. Desta forma, é possível que ambos efeitos contribuam para a redução do prurido crônico, observado durante o tratamento dos animais com GYY4137. Os efeitos benéficos sobre os mastócitos também, podem ser estendidos para a redução do processo inflamatório observado na psoríase, uma vez que a desgranulação destas células é importante para o desenvolvimento da doença (Harvima et al., 2008).

A fim de aprofundar o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares, envolvidos nos efeitos protetores do GYY4137 na psoríase experimental, avaliou-se o balanço do sistema pró-oxidante e antioxidante, visto que pacientes com psoríase apresentam aumento da peroxidação lipídica (Woźniak et al., 2007) e redução da atividade de enzimas antioxidantes, tais como a catalase, SOD e GPx (Nemati et al., 2014). De fato, as atividades da catalase e GST estão reduzidas na pele dos animais com psoríase, embora a atividade de outras enzimas (TrxR, SOD, GPx e GR) não foi afetada. A razão entre o nível de glutationa oxidada (GSSG) e a sua forma reduzida (GSH) foi em torno de 4,5 vezes maior na pele com psoríase, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. Em outro estudo empregando o mesmo modelo, os autores revelaram na pele dos animais concentrações elevadas de glutationa oxidada (GSSG) e redução nos níveis proteicos e de atividade da enzima SOD (Baek et al., 2012), confirmando que existe, de fato, desequilíbrio no balanço do sistema pró-oxidante e antioxidante na psoríase experimental, que mimetiza os achados clínicos em humanos.

Neste estudo, o GYY4137, na maior dose empregada de 100 mg/kg, reverteu significativamente a redução na atividade da catalase nos animais com psoríase, bem como aumentou a atividade das enzimas GR, GPx, GST e paralelamente, reduziu a concentração de GSSG. Estes resultados mostram que o GYY4137 estimula a atividade

das defesas antioxidantes, resultando em maior proteção contra as lesões da pele causadas pelo desequilíbrio redox.

Corroborando esta hipótese, em um modelo experimental de asma alérgica em camundongos, dados publicados do grupo mostram que o tratamento com NaHS aumentou a atividade das enzimas SOD, GR e GPx e, simultaneamente reduziu a inflamação alérgica pulmonar (Benetti et al., 2013). Ademais, Yang et al. (2008) observaram que a deleção da enzima Cistationina-γ-liase, genótipo $CSE^{-/-}$, uma das principais enzimas envolvidas na síntese de H_2S, resultou numa linhagem animal com concentrações séricas e teciduais reduzidas de H_2S e, ainda, baixa concentração basal de glutationa em leitos vasculares. Estudo conduzido por Calvert et al. (2009) demonstrou que o tratamento com o Na_2S num modelo de isquemia e reperfusão cardíaca, promoveu efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular dos animais, resultante do aumento das defesas antioxidantes, visto que uma maior translocação do fator de transcrição Nrf2 para o núcleo, paralelo ao aumento de expressão das enzimas antioxidantes Trx1 e HO-1 foi observado.

A psoríase em humanos (Kumari et al., 2013; Hong et al., 2016) e a induzida experimentalmente por IMQ (Flutter, Nestle, 2013, Chen et., 2017; Dou et al., 2017) esta relacionada à ativação do fator de transcrição NF-κB. Por sua vez, a ativação de NF-κB está correlacionada à elevação nos níveis de TNF-α em pacientes com psoríase (Lizzul et al., 2005), assim como com a progressão dessa doença (Chiricozzi et al., 2011), visto que compostos biológicos bloqueadores de TNF-α, como o Etanercepte, reduzem significativamente a intensidade da psoríase em pacientes (Gottlieb et al., 2005).

Os resultados deste estudo revelaram, via ensaio de mobilidade eletroforética (gel shift), um aumento (50 %) na translocação do NF-κB para o núcleo, na pele dos animais com psoríase, concomitante ao aumento significativo nas concentrações de TNF-α e IL-1β, sem alterações importantes em outras citocinas analisadas (IL-6, IFN-γ e IL-10). Pacientes com psoríase exibem concentrações elevadas de IL-1β no plasma e pele (Tamilselvi et al., 2013), sendo essa citocina importante para diferenciação das células Th17, que participam no desenvolvimento e progressão da psoríase (Perera et al., 2012). A enzima caspase-1, conversora de IL-1β, é responsável por clivar a pró-IL-1β e pró-IL-18, gerando as formas ativas destas citocinas pró-inflamatórias (Thornberry et al., 1992). A pele de pacientes com psoríase abriga uma grande concentração de caspase-1 em sua forma ativa (Johansen et al., 2007), explicando o aumento dos níveis

séricos e locais (pele) da IL-1β na psoríase.

Foi interessante observar que, na vigência do tratamento com o GYY4137 (100 mg/kg), a pele dos animais com a doença exibiu redução da translocação de NF-κB, igualando-se aos valores basais (controle). Corroborando nossos achados, outros modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a ativação do NF-κB foi reduzida por H_2S, como observado em um modelo de lesão renal induzida por isquemia e reperfusão (Tripatara et al., 2008) ou *in vitro* em cultura de astrócitos desafiados por LPS (Lee et al., 2009). Estudos conduzidos por Li et al. (2009) demonstraram ainda que o H_2S reduziu a ativação de NF-κB, bem como os níveis de PGE_2, TNF-α e outros marcadores inflamatórios em cultura de macrófagos desafiados por LPS.

Embora ainda não confirmada em nosso estudo, uma hipótese sobre os possíveis mecanismos moleculares pelo qual o H_2S reduz a translocação de NF-κB para o núcleo, está relacionado com a sua ação sobre o IκBα (Inibidor de NF-κB). O IκBα é membro de uma família de proteínas, que se associam ao fator de transcrição NF-κB e são capazes de mantê-lo em um estado inativo no citoplasma, uma vez fosforilado o IκBα, permite que o NF-κB transloque para o núcleo, onde ele induz a transcrição de genes pró-inflamatórios (Hong et al., 2016). Tal hipótese é baseada em estudos prévios, que demonstraram que doadores de H_2S, tais como NaHS, reduzem a fosforilação e degradação de IκBα, prevenindo desta forma a ativação de NF-κB (Oh et al., 2006; Pan et al., 2011; Chattopadhyay et al., 2012). A redução da ativação de NF-κB, pode estar relacionada com a menor concentração de TNF-α observada nos animais com psoríase tratados com GYY4137 em nosso estudo. Fortalecendo esses resultados, outros autores estabeleceram que o tratamento com doadores de H_2S reduzem a ativação de NF-κB, em conjunto com menor produção de TNF-α (Li et al., 2007; Kalayarasan et al., 2008; Whiteman et al., 2010).

Neste estudo, similar ao observado na pele humana com psoríase, houve um aumento na expressão da caspase-1 e IL-1β na pele dos camundongos com a doença, ao qual foi reduzida pelo tratamento com GYY4137. Este efeito foi associado à melhora da intensidade da psoríase observada durante o tratamento com o doador de H_2S. Corroborando essa sugestão, estudo prévio do grupo demonstrou que na sinovite induzida por carragenina em ratos, o tratamento dos animais com o doador de H_2S reduziu a atividade de caspase-1, concomitantemente com a diminuição da concentração de IL-1β na cavidade articular dos animais (Ekundi-Valentim et al., 2010).

Diversos trabalhos demonstraram que os doadores de H_2S podem reduzir os

níveis de IL-1β (Whiteman et al., 2010; Lo Faro et al., 2014; Mani et al., 2014). Neste estudo, nós observamos que este efeito é relacionado com a menor expressão de caspase-1, porém uma via adicional que pode ser explorada, compreendem os inflamassomas, como o NLRP3 (receptores do tipo NOD P3), o mais estudado entre esta classe de receptores ligados com a resposta inflamatória inata, os receptores desta família são ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMPs), resultando na ativação de caspase-1 (Tschopp, Schroder, 2010). Recentemente, foi demonstrado que doadores de H_2S, tais como NaHS, foram capazes de reduzir a expressão de NLRP3 de forma concomitante com a redução de caspase-1 e IL-1β (Luo et al., 2017). Indicando que o NLRP3 é um alvo adicional para estudo na busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos na redução de caspase-1 e IL-1β provocada por GYY4137 na psoríase experimental.

Em estudo conduzido por Alshorafa et al. (2012), os autores observaram que a concentração sérica de H_2S mostrou-se reduzida em pacientes com psoríase, enquanto as concentrações das citocinas IL-6, IL-8 e TNF-α encontravam-se elevadas em relação aos valores obtidos no sangue de pacientes controles. Surpreendentemente, neste estudo foi revelado que a capacidade de produção de H_2S na pele dorsal dos animais com psoríase foi significativamente inferior àquela mensurada nas amostras do grupo controle. Tais dados são relevantes e validam, pela primeira vez, a importância desse gás na fisiopatologia da psoríase experimental induzida por IMQ, conforme observado em humanos com psoríase, e sugerem fortemente que alterações na concentração endógena basal de H_2S estão associadas à intensidade da doença.

Diante deste conhecimento, foi interessante observar que a expressão da enzima CBS mostrou-se também significativamente reduzida nos animais com psoríase, inclusive nos tratados com GYY4137. A expressão da CSE não foi alterada, indicando que a redução na produção de H_2S é decorrente de alteração na expressão de CBS.

Em conjunto, os dados envolvendo a síntese de H_2S nos animais com psoríase, destacam a importância da suplementação com H_2S, uma vez que durante a doença, ocorre a diminuição na sua capacidade de produção. Interessantemente, alguns estudos demonstram que a inibição da síntese endógena, por meio da utilização de bloqueadores das enzimas CBS e CSE, resulta em efeito oposto ao observado com os doadores de H_2S. Nesse sentido, Roy et al. (2012) observaram em um modelo de hipertensão, que a inibição das enzimas CBS e CSE, foi capaz de aumentar significativamente a pressão arterial em ratos, enquanto a redução da pressão arterial é provocada por diversos

doadores de H_2S (Wang, 2012).

Levando em consideração estes achados, avaliamos se a utilização de um inibidor da CSE (BCA) poderia intensificar a psoríase induzida por IMQ nos camundongos, os dados demonstraram que o tratamento com o inibidor não modificou nenhum dos parâmetros avaliados na psoriase experimental. Isto pode estar relacionado com o fato do protocolo experimental utilizado induzir uma psoríase de nível intenso, portanto com difícil detecção de aumento de intensidade. São necessários mais estudos, utilizando inibidores farmacológicos mais específicos, para avaliar com maior clareza, se a inibição farmacológica das vias relacionadas com síntese de H_2S pode intensificar a psoríase experimental.

Os resultados deste estudo reforçam o consenso atual, demonstrando que os doadores de H_2S representam ferramentas farmacológicas importantes no controle de processos inflamatórios e sensoriais como o prurido, destacando-se ainda a relevância biológica do H_2S endógeno. É importante considerar que o avanço no desenvolvimento de novos doadores de H_2S, com cinética de liberação mais apurada, juntamente com o aprofundamento nas pesquisas utilizando moléculas doadoras de H_2S híbridas, seguindo o exemplo dos AINES doadores de H_2S, poderá favorecer a utilização do H_2S para o tratamento de doenças e afecções de pele em um futuro muito próximo.

5 CONCLUSÕES

i. Doses crescentes dos doadores de H_2S de liberação espontânea e lenta, via injeção i.d., inibiram o prurido agudo, mas não o extravasamento plasmático, induzido por mecanismos dependente e independentes de histamina;

ii. O prurido e extravasamento plasmático induzidos pelo composto desgranulador de mastócitos, C48/80, não foram afetados pelo doador de H_2S de liberação (GYY4137), embora esta molécula tenha inibido o infiltrado neutrófilico frente ao C48/80. Tal ausência de efeito pode estar correlacionada a uma baixa concentração de H_2S liberada no local frente à intensidade do prurido evocado pelo C48/80;

iii. A inibição da enzima CSE, mas não da CBS, envolvidas na síntese de H_2S, intensificou o comportamento do prurido assim como do infiltrado neutrofílico cutâneo induzido pelo C48/80 na pele dorsal de camundongos, indicando que a ausência da síntese endógena de H_2S, via CSE, compromete a integridade da resposta inflamatória na pele murina frente ao estímulo inflamatório do C48/80;

iv. A geração endógena de H_2S na pele naive é significativamente menor do que a geração de H_2S mensurada na pele com inflamação aguda induzida pelo C48/80, indicando que mecanismos compensatórios estão ativados nas primeiras 4 horas pós-injeção;

v. Os doadores de H_2S de liberação espontânea e lenta (GYY4137) inibiram a liberação de histamina de mastócitos in vivo, indicando uma ação estabilizante de mastócitos para o H_2S; entretanto, o GYY4137 (mas não os doadores de liberação espontânea) foi incapaz de prevenir a liberação de mastócitos estimulado *in vitro*. É possível que diferenças na cinética de liberação do H_2S da molécula do GYY4137 *in vitro* e *in vivo* contribua para essa ausência de efeitos no período avaliado;

vi. O pré-tratamento com a glibenclamida, bloqueador dos canais de K_{ATP}, não reverteu o efeito do doador de H_2S de liberação rápida sobre o prurido agudo e inflamação induzidos por histamina, indicando que esse efeito é independente da ativação dos canais de canais de K_{ATP};

vii. Em animais com psoríase, o tratamento sistêmico com o GYY4137 reduziu ($P<0,05$) a inflamação cutânea (escores PASI) e o prurido na psoríase experimental, e inibiu o eixo NF-κB-caspase-1-IL-1β, mas aumentou a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, GST, GR e GPx).

viii. A pele de animais com psoríase exibiu menor capacidade na síntese de H_2S, que foi paralela à menor expressão da enzima CBS. O bloqueador da enzima CSE não interferiu no escore PASI ou prurido.

ix. Conclui-se que moléculas doadoras de H_2S representam novos alvos terapêuticos no controle da inflamação aguda ou imunomediada associada à percepção de prurido agudo e crônico.

REFERÊNCIAS*

Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci. 1996;16(3):1066-71.

Akagi R. Purification and characterization of cysteine aminotransferase from rat liver cytosol. Acta Med Okayama. 1982;36(3):187-97.

Akiyama T, Carstens E. Neural processing of itch. Neuroscience. 2013;250:697-714

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

Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? Br J Pharmacol. 2006;149(6):625-34.

Alshorafa AK, Guo Q, Zeng F, Chen M, Tan G, Tang Z, Yin R. Psoriasis is associated with low serum levels of hydrogen sulfide, a potential anti-inflammatory molecule. Tohoku J Exp Med. 2012;228(4):325-32.

Asimakopoulou A, Panopoulos P, Chasapis CT, Coletta C, Zhou Z, Cirino G, Giannis A, Szabo C, Spyroulias GA, Papapetropoulos A. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). Br J Pharmacol. 2013;169(4):922-32.

Baek JO, Byamba D, Wu WH, Kim TG, Lee MG. Assessment of an imiquimod-induced psoriatic mouse model in relation to oxidative stress. Arch Dermatol Res. 2012;304(9):699-706.

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

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

Belcheva A, Zhelyazkova M. On the interaction between H1- and H2-histaminergic receptors in the histamine release and the realization of its vascular effects in rat skin. Acta Physiol Pharmacol Bulg. 1988;14(4):49-54.

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

---

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

Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, Wallace JL, Teixeira SA, Florenzano J, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. Eur J Pharmacol. 2013;698(1-3):463-9.

Bergasa NV. The pruritus of cholestasis. J Hepatol. 2005;43(6):1078-88. 2005.

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

Bos JD, de Rie MA, Teunissen MB, Piskin G. Psoriasis: dysregulation of innate immunity. Br J Dermatol. 2005; 152(6):1098-107.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;7:248-54.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol. 1982;78(3):206-9.

Burnett WW, King EG, Grace M, Hall WF. Hydrogen sulfide poisoning: review of 5 years' experience. Can Med Assoc J. 1977;117(11):1277-80.

Byamba D, Kim do Y, Kim DS, Kim TG, Jee H, Kim SH, Park TY, Yang SH, Lee SK,Lee MG. Skin-penetrating methotrexate alleviates imiquimod-induced psoriasiform dermatitis via decreasing IL-17-producing gamma delta T cells. Exp Dermatol. 2014;23(7):492-6.

Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer DJ. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. Circ Res. 2009;105(4):365-74.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. Methods Enzymol. 1985;113:484-90.

Chattopadhyay M, Kodela R, Nath N, Barsegian A, Boring D, Kashfi K. Hydrogen sulfide-releasing aspirin suppresses NF-κB signaling in estrogen receptor negative breast cancer cells in vitro and in vivo. Biochem Pharmacol. 2012;83(6):723-32.

Chen H, Lu C, Liu H, Wang M, Zhao H, Yan Y, Han L. Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF-κB pathway. Int Immunopharmacol. 2017;48:110-17.

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

Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H2S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. J Biol Chem. 2009;284(17):11601-12.

Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, Chimenti S, Krueger JG. Integrative responses to IL-17 and TNF-α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. J Invest Dermatol. 2011; 131(3):677-87.

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

Coavoy-Sánchez SA, Rodrigues L, Teixeira SA, Soares AG, Torregrossa R, Wood ME, Whiteman M, Costa SK, Muscará MN. Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice. Pharmacol Res. 2016;113(Pt A):686-694.

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

Costa SK, Moreno H Jr, Brain SD, De Nucci G, Antunes E. The effect of Phoneutria nigriventer (armed spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetised rats. Eur J Pharmacol. 1996;298(2):113-20.

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

Crow JM. Psoriasis uncovered. Nature. 2012:20;492(7429):S50-1.

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

Dal-Secco D, Cunha TM, Freitas A, Alves-Filho JC, Souto FO, Fukada SY, Grespan R, Alencar NM, Neto AF, Rossi MA, Ferreira SH, Hothersall JS, Cunha FQ. Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels. J Immunol. 2008;181(6):4287-98.

Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 2002;39(2 Pt 2):405-11.

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

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

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

Dear JW, Ghali S, Foreman JC. Attenuation of human nasal airway responses to bradykinin and histamine by inhibitors of nitric oxide synthase. Br J Pharmacol. 1996;118(5):1177-82.

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

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

Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;286(4):R678-85.

Dongó E, Beliczai-Marosi G, Dybvig AS, Kiss L. The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. Nitric Oxide. 2017. pii: S1089-8603(17)30263-X.

Dorman DC, Moulin FJ, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. Toxicol Sci. 2002; 65(1):18-25.

Dou R, Liu Z, Yuan X, Xiangfei D, Bai R, Bi Z, Yang P, Yang Y, Dong Y, Su W, Li D, Mao C. PAMs ameliorates the imiquimod-induced psoriasis-like skin disease in mice by inhibition of translocation of NF-κB and production of inflammatory cytokines. PLoS One. 2017; 12(5):e0176823.

Dufton N, Natividad J, Verdu EF, Wallace JL. Hydrogen sulfide and resolution of acute inflammation: A comparative study utilizing a novel fluorescent probe. Sci Rep. 2012; 2:499

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

Ekundi-Valentim E, Mesquita FP, Santos KT, de Paula MA, Florenzano J, Zanoni CI, Rodrigues L, de Nucci G, Teixeira SA, Ferreira HH, Wallace JL, Costa SK, Muscará MN. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H2S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. Med Gas Res. 2013;3(1):24.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. Br J Pharmacol. 2010;159(7):1463-74.

Elies J, Scragg JL, Huang S, Dallas ML, Huang D, MacDougall D, Boyle JP, Gamper N, Peers C. Hydrogen sulfide inhibits Cav3.2 T-type Ca2+ channels. FASEB J. 2014; 28(12):5376-87.

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

Enerback, I., Svenson, I. Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of Percoll. J. Immunol. Methods. 1980; 39: 135–142.

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

Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. Gastroenterology. 2006;131(1):259-71.

Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. Curr Rheumatol Rep. 2007;9(6):461-7.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1984;105:114-21.

Flutter B, Nestle FO. TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. Eur J Immunol. 2013;43(12):3138-46.

Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem. 1980;26(2):227-31.

Fu Z, Liu X, Geng B, Fang L, Tang C. Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury. Life Sci. 2008;82(23-24):1196-202.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288(5789):373-6.

Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. Biochem Pharmacol. 2001;62(2):255-9.

Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thürlimann W, Burg G, Nestle FO, Dummer R. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. Arch Dermatol. 2004;140(12):1490-5.

Gobbi G, Ricci F, Malinverno C, Carubbi C, Pambianco M, Panfilis Gd, Vitale M, Mirandola P. Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling. Lab Invest. 2009;89(9):994-1006.

Gottlieb AB, Dann F. Comorbidities in patients with psoriasis. Am J Med. 2009;122(12):1150.e1-9.

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

Griffith OW. Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. Methods Enzymol. 1987;143:366-76.

Grossmann M, Jamieson MJ, Kirch W. Histamine response and local cooling in the human skin: involvement of H1- and H2-receptors. Br J Clin Pharmacol. 1999;48(2):216-22.

Guan Q, Wang X, Gao L, Chen J, Liu Y, Yu C, Zhang N, Zhang X, Zhao J. Hydrogen sulfide suppresses high glucose-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol. 2013;62(3):278-84.

Guidotti TL. Hydrogen sulphide. Occup Med (Lond). 1996;46(5):367-71.

Guidotti TL. Occupational exposure to hydrogen sulfide in the sour gas industry: some unresolved issues. Int Arch Occup Environ Health.1994;66(3):153-60.

Gutzmer R, Gschwandtner M, Rossbach K, Mommert S, Werfel T, Kietzmann M, Baeumer W. Pathogenetic and therapeutic implications of the histamine H4 receptor in inflammatory skin diseases and pruritus. Front Biosci (Schol Ed). 2011;3:985-94.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974;249(22):7130-9.

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

Harvima IT, Nilsson G, Suttle MM, Naukkarinen A. Is there a role for mast cells in psoriasis? Arch Dermatol Res. 2008 Oct;300(9):461-78.

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

Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, Ruckenstuhl C, Lee BC, Brace L, Longchamp A, Treviño-Villarreal JH, Mejia P, Ozaki CK, Wang R, Gladyshev VN, Madeo F, Mair WB, Mitchell JR. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. Cell. 2015 Jan 15;160(1-2):132-44.

Hong KK, Gwak MJ, Song J, Kim NI. Nuclear factor-κB pathway activation and phosphatase and tensin homolog downregulation in psoriasis. Br J Dermatol. 2016;174(2):433-5.

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun. 1997;237(3):527-31.

Hughes MN, Centelles MN, Moore KP. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. Free Radic Biol Med. 2009 Nov 15;47(10):1346-53.

Ignarro LJ, Burke TM, Wood KS, Wolin MS, Kadowitz PJ. Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. J Pharmacol Exp Ther. 1984;228(3):682-90.

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

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

Imamachi N, Park GH, Lee H, Anderson DJ, Simon MI, Basbaum AI, Han SK. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(27):11330-5.

Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. Biochem J. 2004;381(Pt 1):113-23.

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

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

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H(2)S-induced activation of K(ATP) channels. Antioxid Redox Signal. 2010;12(10):1167-78.

Jiang W, Kreis ME, Eastwood C, Kirkup AJ, Humphrey PP, Grundy D. 5-HT(3) and histamine H(1) receptors mediate afferent nerve sensitivity to intestinal anaphylaxis in rats. Gastroenterology. 2000;119(5):1267-75.

Jin H, Koyama T, Hatanaka Y, Akiyama S, Takayama F, Kawasaki H. Histamine-induced vasodilation and vasoconstriction in the mesenteric resistance artery of the rat. Eur J Pharmacol. 2006;529(1-3):136-44.

Johansen C, Kragballe K, Westergaard M, Henningsen J, Kristiansen K, Iversen L. The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. Br J Dermatol. 2005;152(1):37-42.

Johansen C, Moeller K, Kragballe K, Iversen L. The activity of caspase-1 is increased in lesional psoriatic epidermis. J Invest Dermatol. 2007;127(12):2857-64.

Johansen C, Mose M, Ommen P, Bertelsen T, Vinter H, Hailfinger S, Lorscheid S, Schulze-Osthoff K, Iversen L. IκBζ is a key driver in the development of psoriasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(43):E5825-33.

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

Kabil O, Vitvitsky V, Xie P, Banerjee R. The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H2S production in murine tissues. Antioxid Redox Signal. 2011;15(2):363-72.

Kalayarasan S, Sriram N, Sudhandiran G. Diallyl sulfide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis: critical role of iNOS, NF-kappaB, TNF-alpha and IL-1beta. Life Sci. 2008;82(23-24):1142-53.

Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. Diabetes. 2006;55(5):1391-7.

Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. Diabetes. 2006;55(5):1391-7.

Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. Amino Acids.

2004;26(3):243-54.

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

Khan AA, Schuler MM, Prior MG, Yong S, Coppock RW, Florence LZ, Lillie LE. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 1990;103(3):482-90.

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

Kimura H. Metabolic turnover of hydrogen sulfide. Front Physiol. 2012;3:101.

Kimura H. Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfide. Antioxid Redox Signal. 2015;22(5):362-76.

Kremer AE, Feramisco J, Reeh PW, Beuers U, Oude Elferink RP. Receptors, cells and circuits involved in pruritus of systemic disorders. Biochim Biophys Acta.2014;1842(7):869-92.

Kumari S, Bonnet MC, Ulvmar MH, Wolk K, Karagianni N, Witte E, Uthoff-Hachenberg C, Renauld JC, Kollias G, Toftgard R, Sabat R, Pasparakis M, Haase I. Tumor necrosis factor receptor signaling in keratinocytes triggers interleukin-24-dependent psoriasis-like skin inflammation in mice. Immunity. 2013;39(5):899-911.

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

Lamontagne F, Meade M, Ondiveeran HK, Lesur O, Fox-Robichaud AE. Nitric oxide donors in sepsis: a systematic review of clinical and in vivo preclinical data.Shock. 2008;30(6):653-9.

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

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

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

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

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

Lima EA, Lima MA. Imunoptogênese da psoríase: revisando conceitos. An Bras Dermatol. 2011; 86(6):1151-8.

Liss B, Roeper J. Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). Mol Membr Biol. 2001; 18(2):117-27.

Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, Kim S, Patel KN, Kim A, Ru F, Guan Y, Weng HJ, Geng Y, Undem BJ, Kollarik M, Chen ZF, Anderson DJ, Dong X. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. Cell. 2009;139(7):1353-65.

Liu Q, Weng HJ, Patel KN, Tang Z, Bai H, Steinhoff M, Dong X. The distinct roles of two GPCRs, MrgprC11 and PAR2, in itch and hyperalgesia. Sci Signal. 2011;4(181):ra45.

Lizzul PF, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Masud S, Dombrovskiy V, Gottlieb AB. Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept. J Invest Dermatol. 2005;124(6):1275-83.

Lo Faro ML, Fox B, Whatmore JL, Winyard PG, Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. Nitric Oxide. 2014;41:38-47.

Łowicka E, Bełtowski J. Hydrogen sulfide (H2S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol Rep. 2007;59(1):4-24

Luo ZL, Ren JD, Huang Z, Wang T, Xiang K, Cheng L, Tang LJ. The Role of Exogenous Hydrogen Sulfide in Free Fatty Acids Induced Inflammation in Macrophages. Cell Physiol Biochem. 2017;42(4):1635-44.

Mabuchi T, Chang TW, Quinter S, Hwang ST. Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. J Dermatol Sci. 2012;65(1):4-11.

Mani S, Untereiner A, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis. Antioxid Redox Signal. 2014;20(5):805-17.

Marks R, Greaves MW. Vascular reactions to histamine and compound 48/80 in human skin: suppression by a histamine H2-receptor blocking agent. Br J Clin Pharmacol. 1977;4(3):367-9.

Martin GR, McKnight GW, Dicay MS, Coffin CS, Ferraz JG, Wallace JL. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. Dig Liver Dis. 2010; 42(2):103-9.

Matsunami M, Tarui T, Mitani K, Nagasawa K, Fukushima O, Okubo K, Yoshida S, Takemura M, Kawabata A. Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. Gut. 2009;58(6):751-61.

Matz H, Orion E, Wolf R. Balneotherapy in dermatology. Dermatol Ther. 2003;16(2):132-40.

McNeil BD, Pundir P, Meeker S, Han L, Undem BJ, Kulka M, Dong X. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. Nature. 2015; 519(7542):237-41.

Mizokami SS, Arakawa NS, Ambrosio SR, Zarpelon AC, Casagrande R, Cunha TM, Ferreira SH, Cunha FQ, Verri WA Jr. Kaurenoic acid from Sphagneticola trilobata Inhibits Inflammatory Pain: effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. J Nat Prod. 2012;75(5):896-904.

Moon TC, Befus AD, Kulka M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. Front Immunol. 2014;5:569.

Moore PK, Bhatia M, Moochhala S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? Trends Pharmacol Sci. 2003;24(12):609-11.

Moustafa A, Habara Y. Reciprocal interaction among gasotransmitters in isolated pancreatic β-cells. Free Radic Biol Med. 2016;90:47-58.

Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. J Neurosci. 2006;26(14):3813-20.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. H2S signals through protein S-sulfhydration. Sci Signal. 2009;2(96).

Naldi L. Risk factors for psoriasis. Curr Derm Rep. 2013;(2):58–65.

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

Nemati H, Khodarahmi R, Sadeghi M, Ebrahimi A, Rezaei M, Vaisi-Raygani A. Antioxidant status in patients with psoriasis. Cell Biochem Funct. 2014;32(3):268-273. Erratum in: Cell Biochem Funct. 2014 Oct;32(7):620.

Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Mechanisms of disease Psoriasis. N Engl J Med. 2009;(361):496-509.

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

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

Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the immunologic basis of psoriasis. Semin Cutan Med Surg. 2010 Mar;29(1):3-9.

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

Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Free Radic Biol Med. 2006;41(1):106-19.

Ohsawa Y, Hirasawa N. The antagonism of histamine H1 and H4 receptors ameliorates chronic allergic dermatitis via anti-pruritic and anti-inflammatory effects in NC/Nga mice. Allergy. 2012;67(8):1014-22.

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

Olson KR, DeLeon ER, Liu F. Controversies and conundrums in hydrogen sulfide biology. Nitric Oxide. 2014;41:11-26.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 1988;333(6174):664-6.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987;327(6122):524-6.

Pan LL, Liu XH, Gong QH, Zhu YZ. S-Propargyl-cysteine (SPRC) attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory response in H9c2 cells involved in a hydrogen sulfide-dependent mechanism. Amino Acids. 2011;41(1):205-15.

Patel D, Welsh D, Baker M. Comparative study of propyleneglycol and caprylic/capric triglyceride vehicles for topical application. J Soc Cosmet Chem. 1985;36:303-11.

Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson RJ. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. Reprod Biol Endocrinol. 2009;7:10.

Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. Annu Rev Pathol. 2012;7:385-422.

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

Popovich AIa, Gavrilishina GE. [Use of hydrogen sulfide baths from Konopkivka spring in the overall treatment of hypertension]. Vrach Delo. 1979;(11):36-7.

Qu K, Chen CP, Halliwell B, Moore PK, Wong PT. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. Stroke. 2006;37(3):889-93.

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

Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1992;32:109-34.

Robert K, Vialard F, Thiery E, Toyama K, Sinet PM, Janel N, London J. Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. J Histochem Cytochem. 2003;51(3):363-71.

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

Rodrigues L, Santos BC, Florenzano J, Dos Santos KT, Lopes KC, Lira FB, Teixeira SA, Wood ME, Whiteman M, Muscará MN, Costa SK. Does the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 controls inflammation and pruritogen responses in mouse skin? Nitric Oxide. 2013 Sep 1;31 Suppl 2:S54-5. doi: 10.1016/j.niox.2013.06.106.

Rodrigues L, Schmidt TP, Florenzano J, Santos KT, Cerqueira AR, Teixeira AS, Wood M, Whiteman M, Muscará MN, Costa SKP. The slow-releasing hydrogen sulphide donor, GYY4137, exhibits novel anti-skin symptoms of psoriasis and related itch. Nitric Oxide. 2015; 47, Supplement,S35. doi.org/10.1016/j.niox.2015.02.084.

Rodrigues L, Ekundi-Valentim E, Florenzano J, Cerqueira AR, Soares AG, Schmidt TP, Santos KT, Teixeira SA, Ribela MT, Rodrigues SF, de Carvalho MH, De Nucci G, Wood M, Whiteman M, Muscará MN, Costa SK. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. Pharmacol Res. 2017;115:255-66.

Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. J Neurochem. 1996;67(2):662-8.

Rose P, Moore PK, Zhu YZ. H(2)S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. Cell Mol Life Sci. 2017;74(8):1391-1412.

Roy A, Khan AH, Islam MT, Prieto MC, Majid DS. Interdependency of cystathione γ-lyase and cystathione β-synthase in hydrogen sulfide-induced blood pressure regulation in rats. Am J Hypertens. 2012;25(1):74-81.

Sabo GP. [Hydrogen sulfide carbon dioxide mud baths as a new balneologic factor]. Sov Med. 1950;9:26-7.

Sakai K, Sanders KM, Youssef MR, Yanushefski KM, Jensen L, Yosipovitch G, Akiyama T. Mouse model of imiquimod-induced psoriatic itch. Pain. 2016;157(11):2536-43.

Sanchez APG. Imunopatogênese da psoríase. An Bras Dermatol. 2010;85(5):747-9.

Saria A, Hua X, Skofitsch G, Lundberg JM. Inhibition of compound 48/80--induced vascular protein leakage by pretreatment with capsaicin and a substance P antagonist. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1984; 328(1):9-15.

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

Schmelz M. Itch and pain. Neurosci Biobehav Rev. 2010 Feb;34(2):171-6.

Schmidt TP. Avaliação farmacológica de uma nanodispersão contendo GYY4137 (doador de liberação lenta de H2S) na psoríase experimental. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)].São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. Science. 1991;254(5037):1503-6.

Searcy DG, Lee SH. Sulfur reduction by human erythrocytes. J Exp Zool. 1998; 282(3):310-22.

Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. FASEB J. 2007;21(2):325-32.

Shibata S, Tada Y, Asano Y, Yanaba K, Sugaya M, Kadono T, Kanda N, Watanabe S, Sato S. IL-27 activates Th1-mediated responses in imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions. J Invest Dermatol. 2013;133(2):479-88.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. J Biochem. 2009b;146(5):623-6.

Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. Antioxid Redox Signal. 2009a;11(4):703-14.

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

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

Spiller F, Orrico MI, Nascimento DC, Czaikoski PG, Souto FO, Alves-Filho JC, Freitas A, Carlos D, Montenegro MF, Neto AF, Ferreira SH, Rossi MA, Hothersall JS, Assreuy J, Cunha FQ. Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K+ATP channel activation. Am J Respir Crit Care Med. 2010;182(3):360-8.

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

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

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

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

Sun J, Dou W, Zhao Y, Hu J. A comparison of the effects of topical treatment of calcipotriol, camptothecin, clobetasol and tazarotene on an imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2014;36(1):17-24.

Sun J, Zhao Y, Hu J. Curcumin inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation by inhibiting IL-1beta and IL-6 production in mice. PLoS One. 2013;8(6).

Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt SE, Bevan S, Andersson KE, Högestätt ED, Zygmunt PM. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. Eur Urol. 2008;53(2):391-9.

Szabo C, Papapetropoulos A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H(2)S Levels: H(2)S Donors and H(2)S Biosynthesis Inhibitors. Pharmacol Rev. 2017;69(4):497-564.

Szabo C. A timeline of hydrogen sulfide (H(2)S) research: From environmental toxin to biological mediator. Biochem Pharmacol. 2017. pii:S0006-2952(17)30606-8.

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

Takahashi N, Tominaga M, Kosaka R, Kamata Y, Umehara Y, Matsuda H, Sakaguchi A, Ogawa H, Takamori K. Involvement of μ-opioid Receptors and κ-opioid Receptors in Itch-related Scratching Behaviour of Imiquimod-induced Psoriasis-like Dermatitis in Mice. Acta Derm Venereol. 2017;97(8):928-33.

Takano N, Arai I, Hashimoto Y, Kurachi M. Evaluation of antipruritic effects of several agents on scratching behavior by NC/Nga mice. Eur J Pharmacol. 2004;495(2-3):159-65.

Tamilselvi E, Haripriya D, Hemamalini M, Pushpa G, Swapna S. Association of disease severity with IL-1 levels in methotrexate-treated psoriasis patients. Scand J Immunol. 2013;78(6):545-53.

Teicher C, De Col R, Messlinger K. Hydrogen Sulfide Mediating both Excitatory and Inhibitory Effects in a Rat Model of Meningeal Nociception and Headache Generation. Front Neurol. 2017;8:336.

Telezhkin V, Brazier SP, Cayzac S, Müller CT, Riccardi D, Kemp PJ. Hydrogen sulfide inhibits human BK(Ca) channels. Adv Exp Med Biol. 2009;648:65-72.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. Nature. 1992;356(6372):768-74.

Thurmond RL. The histamine H4 receptor: from orphan to the clinic. Front Pharmacol. 2015 Mar;6:65.

Tortola L, Rosenwald E, Abel B, Blumberg H, Schäfer M, Coyle AJ, Renauld JC, Werner S, Kisielow J, Kopf M. Psoriasiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. J Clin Invest. 2012;122(11):3965-76.

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

Tripatara P, Patel NS, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart KN, Brown PA, Yaqoob MM, Fantozzi R, Thiemermann C. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. Lab Invest. 2008;88(10):1038-48.

Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nat Rev Immunol. 2010;10(3):210-5.

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

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

Ukeda H, Hasegawa Y, Ishi T, Sawamura M. Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by intermediates of Maillard reaction and glycolytic pathway and some sugars. Biosci Biotechnol Biochem. 1997;61(12):2039-42.

van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. J Immunol. 2009;182(9):5836-45.

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

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

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

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

Wang XL, Tian B, Huang Y, Peng XY, Chen LH, Li JC, Liu T. Hydrogen sulfide-induced itch requires activation of Cav3.2 T-type calcium channel in mice. Sci Rep. 2015; 5:16768. Erratum in: Sci Rep. 2017; 7:46906.

Watt MM, Watt SJ, Seaton A. Episode of toxic gas exposure in sewer workers. Occup Environ Med. 1997;54(4):277-80.

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

Wilson SR, Gerhold KA, Bifolck-Fisher A, Liu Q, Patel KN, Dong X, Bautista DM. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. Nat Neurosci. 2011;14(5):595-602.

Woźniak A, Drewa G, Krzyzyńska-Maliniowska E, Czajkowski R, Protas-Drozd F, Mila-Kierzenkowska C, Rozwodowska M, Sopońska M, Czarnecka-Zaba E. Oxidant-antioxidant balance in patients with psoriasis. Med Sci Monit. 2007;13(1):CR30-3.

Xia H, Zhang D, Yang S, Wang Y, Xu L, Wu J, Ren J, Yao W, Fan L, Zhang C, Tian Y, Pan HL, Wang X. Role of ATP-sensitive potassium channels in modulating nociception in rat model of bone cancer pain. Brain Res. 2014;1554:29-35.

Yanaba K, Kamata M, Ishiura N, Shibata S, Asano Y, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Tedder TF, Sato S. Regulatory B cells suppress imiquimod-induced, psoriasis-like skin inflammation. J. Leukoc. Biol. 2013;(94):563–57.

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science. 2008;322(5901):587-90.

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science. 2008;322(5901):587-90.

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

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

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

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

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

Zimmermann KK, Spassov SG, Strosing KM, Ihle PM, Engelstaedter H, Hoetzel A, Faller S. Hydrogen Sulfide Exerts Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects in Acute Lung Injury. Inflammation. 2017. doi: 10.1007/s10753-017-0684-4.