



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

O PRURIDO MEDIADO PELO RECEPTOR PARA O PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA
(GRPR) É DEPENDENTE DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K γ /Akt

PAULA JULIANA BRIZUELA DE SEADI PEREIRA

**Porto Alegre
2016**

O PRURIDO MEDIADO PELO RECEPTOR PARA O PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA
(GRPR) É DEPENDENTE DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K γ /Akt

PAULA JULIANA BRIZUELA DE SEADI PEREIRA

Orientador:
Dra. Maria Martha Campos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Porto Alegre
2016

PAULA JULIANA BRIZUELA DE SEADI PEREIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Aprovada em: 20 de Janeiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Robson da Costa (UFRJ)



Prof. Dr. Rafael Roesler (UFRGS)



Prof. Dr. Luiz Augusto Basso (PUCRS)

Porto Alegre
2016

A los nonos Juan y Tita, porque son los mejores.

Aos meus pais Manoel e Lourdes, porque são meus exemplos.

AGRADECIMENTOS

À minha mentora, Prof^a. Maria Martha Campos, que é a grande responsável por eu ter me apaixonado pela pesquisa científica e pela farmacologia. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pelo apoio, pela dedicação, pelo incentivo, pela confiança e principalmente pela amizade que vou levar para o resto da vida. Não tenho palavras suficientes para agradecer.

À Prof^a. Fernanda Bueno Morrone, por ter aberto as portas do Laboratório de Farmacologia Aplicada e me acolhido na família LAFAP. Pelo incentivo, pela amizade e pelos ensinamentos.

To Dr. Ethan Lerner, for welcoming me into his laboratory at the Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital. For the opportunities, teachings, challenges and trust. For having contributed to the quality of this work. Thank you very much!

To Dr. Clifford Woolf, for kindly allowing me the access to his laboratory, facilities and equipments. They were very important for the success of this work.

To my friends Yung-Chih Cheng and Cedric Laedermann; for your help, expertise and professionalism.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica e fiéis escudeiros: Gustavo D.B. Machado, Giuliano Danesi e Francesca Canevese. Pelo trabalho árduo, competência, simplicidade, bom humor e amizade. Eu não teria conseguido sem a ajuda de vocês. Foi um prazer ter trabalhado com vocês durante estes anos de doutorado. Muito obrigada, vocês são demais!

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Aplicada e INTOX, pelo apoio, carinho e amizade. Pelos almoços e cafezinhos. Pelas boas risadas.

Às amigas Raquel dal Sasso e Kesiane da Costa; por toda a ajuda, torcida, parceria, pelo carinho e amizade. Obrigada gurias!

Às quase irmãs Adriana Rembowski e Mariana Prado, por tantos anos de amizade e apoio.

Às amigas Gabriela Bencke, Juliana Tomasi, Manoela Marimon, Claudia Vilella, Maria Claudia e Maria Thereza Luce; por serem eternamente as “gurias do ballet”, pelo carinho, amizade e pela constante torcida.

À mon amour, Sébastien Talbot, por ser meu companheiro e melhor amigo. Pelo apoio incondicional, pelos “brainstorms” científicos, pela imensa paciência, amor, dedicação e ajuda. Merci beaucoup! Je T’aime!

Aos meus avós Juan Brizuela e Beatriz Pedotti; pelo amor, pelo apoio e por sempre rezarem por mim.

Aos caninos Mora, Pepper e Lennon; pelo amor incondicional, pelas mostras de carinho tão sinceras, pelos sorrisos e por me fazerem um ser humano melhor.

À minha família; por compreender as minhas escolhas, pelo apoio, incentivo e amor. Pai e Mãe, obrigada por me ensinarem a ser persistente e correta. Por tantos “o hacés bien o no hagás”. Luli, obrigada pelos momentos que muitas vezes só nós entendemos e achamos divertidos. Pela torcida e parceria. Muito obrigada por tudo. Amo muito vocês!

À CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste doutorado e pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

“Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) e seu receptor (GRPR) foram recentemente identificados como componentes específicos do prurido, com importante potencial farmacológico; no entanto, os mecanismos intracelulares que medeiam a atividade do sistema GRP/GRPR permanecem desconhecidos. O presente estudo avaliou a localização do GRPR e as vias de sinalização *downstream* ativadas por este receptor. Os dados obtidos mostram que o GRP ativa diretamente neurônios de pequeno diâmetro do DRG, sensíveis a capsaicina, um efeito demonstrado pelo fluxo transitório de cálcio e pela despolarização da membrana. O perfil de expressão observado sugere que a PI3K γ é ativada *downstream* ao sistema GRP/GRPR, como indicado pela fosforilação de Akt (marcador de atividade de PI3K γ) induzida por GRP, em medulas de camundongos *ex vivo* e, em células HEK293 transfectadas com GRPR. Contudo, a aplicação de GRP em medulas de camundongos, *ex vivo*, não parece depender da ativação das MAP-quinases, ERK1/2 ou p38. A injeção intratecal de GRP leva a um comportamento de coçar intenso, que é significativamente reduzido por antagonistas de GRPR ou pela inibição farmacológica de PI3K γ . Para avaliar se o sistema GRP/GRPR estaria envolvido no prurido crônico, foi empregado o modelo de pele seca em camundongos. Neste paradigma experimental, o bloqueio de GRPR ou de PI3K γ reverteu o comportamento de coçar. Os dados obtidos também mostram que p-Akt e GRPR estão co-localizados na medula espinhal e em neurônios do DRG de animais com pele seca e, que os níveis de p-Akt estão aumentados nesses animais, um efeito que foi prevenido pelo bloqueio de GRPR. A injeção intradérmica de GRP também induziu o comportamento de coçar, que foi significativamente reduzido após o tratamento com inibidor de PI3K γ . Finalmente, foi demonstrado que a injeção intratecal de um ativador de Akt foi capaz

de induzir coceira em camundongos. O conjunto de resultados obtidos sugere que o GRPR é expresso por terminais periféricos e centrais de neurônios nociceptivos do DRG, transmitindo o prurido através da ativação da via PI3K γ /Akt.

Palavras-chave: AS605240; GRPR; medula espinhal; pele seca; PI3K γ ; prurido.

ABSTRACT

The gastrin-releasing peptide (GRP) and its receptor (GRPR) were recently identified as specific components of pruritus, suggesting an important pharmacological potential for this system; however, the mechanisms underlying GRP/GRPR activity remain undefined. Herein, we evaluated GRPR localization and downstream signaling pathways. Our data show that GRP directly activates small-size capsaicin-sensitive DRG neurons, an effect that translates into transient calcium flux and membrane depolarization. Expression profile revealed that PI3K γ is downstream of the GRP/GRPR axis, observed by GRP-induced Akt phosphorylation in *ex vivo* naive mouse spinal cords and in GRPR transiently expressing HEK293 cells. However, *ex vivo* mouse spinal cord stimulation by GRP failed to induce the activation of MAP-kinases, namely ERK 1/2 and p38. Intrathecal GRP administration led to intense scratching behavior, an effect significantly reduced by either GRPR antagonism or the PI3K γ inhibition. We assessed whether the GRP/GRPR system is involved in chronic itching using the dry skin model and found that GRPR blockade or PI3K γ inhibition reversed the scratching. We also found that p-Akt and GRPR are co-expressed in the spinal cord and in DRG neurons from dry skin mice, and that p-Akt levels are increased in these animals, an effect prevented by GRPR blockade. The intradermal injection of GRP also triggers scratching behavior, which was significantly decreased after treatment with PI3K γ inhibitor. The itching response was also induced by the intrathecal injection of an Akt activator. Altogether, these findings are highly suggestive that GRPR is expressed by the peripheral and central terminals of DRG nociceptive afferents, which transmit itch via the PI3K γ /Akt pathway.

Key words: AS605240; dry skin; GRPR; itch; PI3K γ ; spinal cord.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Teorias propostas para a transmissão de prurido	25
Figura 2 – Mecanismos de ativação da classe I de PI3Ks	34
Figura suplementar 1 – Inibidor seletivo de PI3K γ e comportamento nociceptivo.....	53
Figura suplementar 2 – Expressão de RNAm para GRPR na medula de camundongos..	54
Figura suplementar 3 – Co-localização de GRPR e p-Akt na medula de animais com prurido crônico	55
Figura suplementar 4 – Caracterização de células do DRG que expressam p-Akt.....	57
Figura suplementar 5 – Administração de GRP por via intradérmica e indução de prurido	58

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT- Serotonina

5-HT1A - Receptor de serotonina 1A

AEW - Acetona, éter e água; modelo de pele seca

Akt/PKB - Proteína quinase B

ATP- Adenosina trifosfato

Bn - Bombesina

CD45 - Cluster de diferenciação 45

CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CQ - cloroquina

DRG - Gânglio da raiz dorsal

DW - Água destilada

EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

ET-1 - endotelina-1

ET_A - Receptor de endotelina tipo A

FSC - Tamanho celular

GFAP- Proteína ácida fibrilar glial

GPCR - Receptor acoplado à proteína G

GRP - Peptídeo liberador de gastrina

GRPR/BB₂ - Receptor para o peptídeo liberador de gastrina

H1R - Receptor de histamina H1

H4R - Receptores de histamina H4

HTR₇ - Receptor de serotonina 7

i.d. - Inradérmica

i.t.- Intratecal

IFSI - International forum for the study of itch

IL-31 - Interleucina 31

IL-31R - Receptor de interleucina 31

KO - Animais *knockout*

MAPKs - Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MFI - Média de intensidade de fluorescência

MOP - Peptídeo opioide mu (μ)

MOR1D - Isoforma 1D do receptor opioide mu (μ)

MrgprA3 - Receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas tipo A3

mTORC2 - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos complexo 2

p-Akt - Proteína quinase B fosforilada

PAR-2 - Receptor ativado por protease 2

PAR-4 - Receptor ativado por protease 4

PDK1 - Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos 1

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

PI3K α - Fosfatidilinositol-3-quinase isoforma alfa

PI3K β - Fosfatidilinositol-3-quinase isoforma beta

PI3K γ - Fosfatidilinositol-3-quinase isoforma gama

PI3K δ - Fosfatidilinositol-3-quinase isoforma delta

PIP₂- Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP₃- Fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato

PKC - Proteína quinase C

PKC γ - Proteína quinase C isoforma gama

PLC - Fosfolipase C

PLC- β 2 - Fosfolipase C β 2

RNA_m - ácido ribonucleico

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa

SNC- Sistema nervoso central

SP - Substância P

SSC - Complexidade celular

TGI- Trato gastrintestinal

TLR3- Receptor Toll-like do tipo 3

TLR7- Receptor Toll-like do tipo 7

TRPA1- receptor de potencial transitório anquirina tipo 1

TRPV1- Receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1

TSLP - Linfopoetina estromal tímica

TSLPR - Receptor de linfopoetina estromal tímica

Tuj1- Beta-tubulina classe III neurônio-específica

SUMÁRIO

Capítulo I	17
1. Introdução	18
1.1. O Prurido.....	18
1.2. O Peptídeo Liberador de Gastrina e seu Receptor	29
1.3. A Fosfatidilinositol 3-Quinase γ	32
2. Objetivos	37
2.1. Objetivo Geral.....	37
2.2. Objetivos Específicos	37
Capítulo II	39
3. Manuscrito publicado no periódico <i>Journal of Neuroscience</i>	40
Capítulo III	50
4. Considerações Finais	51
5. Perspectivas	59
6. Referências Bibliográficas	60
ANEXOS	69
ANEXO I - Carta de Aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais	70
ANEXO II – Parecer do Orientador no exterior pelo período do Doutorado Sanduíche (Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, EUA)	72
ANEXO III – Comentário publicado: “Interneurons Scratch a Itch”. <i>Neuron</i> , 2014. 74	

ANEXO IV – Email recebido após submissão de artigo, como co-autora, para o periódico <i>Nature Neuroscience</i> , 2015	79
ANEXO V – Autorização do periódico <i>Journal of Neuroscience</i> para a utilização do manuscrito publicado como parte desta tese	81
ANEXO VI – Autorização para a utilização de figuras publicadas pelos periódicos <i>ACS Chemical Neuroscience</i> e <i>Nature Reviews Immunology</i>	83

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Prurido

1.2. O Peptídeo Liberador de Gastrina e seu Receptor

1.3. A Fosfatidilinositol 3-Quinase γ

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

2.2. Objetivos Específicos

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Prurido

O prurido, também conhecido como coceira, tem sido objeto de curiosidade, sendo mencionado em diversos documentos no decorrer da história da humanidade. O registro mais antigo é da época do Antigo Egito e se encontra no *Papyrus Ebers*, datado aproximadamente de 1550 a.C. As primeiras tentativas de entender o prurido foram descritas no *Corpus Hippocraticum*, por volta do século V a.C. Todavia, foi apenas em 1660, que o médico alemão Samuel Haffenreffer definiu pela primeira vez o prurido como “uma sensação desagradável que leva ao desejo ou reflexo de coçar”, uma definição ainda válida atualmente (Ikoma et al., 2006, Binder et al., 2008, Weisshaar et al., 2009). O paciente mais famoso na história do prurido foi Jean-Paul Marat (1743-1793), criador do famoso jornal *L' Ami du Peuple* (O Amigo do Povo) e um dos líderes intelectuais da Revolução Francesa. Ele sofria de uma doença de pele crônica, severa, incapacitante, bolhosa e intensamente pruriginosa. Alguns historiadores sugerem que a pele desfigurada pela doença e o prurido fizeram com que Marat fosse tratado como um leproso, sendo rejeitado pela classe educada e pela classe média, se aproximando das camadas inferiores da sociedade francesa. O prurido insuportável haveria afetado a personalidade de Marat, tornando-o mais agressivo e favorecendo seus pensamentos e atos radicais. Assim, o prurido crônico teria influenciado o curso da revolução e feito história (Weisshaar et al., 2009). Durante muito tempo, o prurido foi considerado uma modalidade ou um subtipo de dor, devido a muitas similaridades relativas à sua transmissão (Sun et al., 2009). Atualmente, sabe-se que dor e prurido

são duas experiências sensoriais distintas e provocam respostas comportamentais diferentes: o reflexo de retirada e o ato de coçar, respectivamente (Ross, 2011).

O prurido não é uma doença *per se*, mas serve como um mecanismo de alerta e autoproteção, com o objetivo de defender o organismo contra agentes externos, potencialmente nocivos. É uma sensação conservada em humanos e animais. Sabe-se que vários mamíferos, aves e répteis sentem coceira e, o ato de coçar pode remover da pele possíveis ameaças como insetos, ácaros e plantas (Stander et al., 2003, Metz et al., 2011, Liu e Ji, 2012). No entanto, as vantagens biológicas e evolutivas de coçar o local que esteja coçando ainda não são entendidas (LaMotte et al., 2014). Além de exercer um papel protetor, é um sintoma comum que acompanha muitas doenças inflamatórias da pele, incluindo dermatite atópica, psoríase e infecções. Também é um sintoma de algumas condições sistêmicas, como doença renal crônica, colestase, diabetes, infecção por HIV e certos tipos de tumores (Miyamoto et al., 2002, Weisshaar e Dalgard, 2009, Chiang et al., 2011). Pode ser ainda, um efeito adverso bastante comum de muitos medicamentos, como por exemplo: antibióticos, antifúngicos, analgésicos opioides, antimaláricos, quimioterápicos e terapias anti-receptor de fator de crescimento epidermal (anti-EGFR) (Weisshaar e Dalgard, 2009, Chiang et al., 2011, Miyamoto e Patapoutian, 2011).

Embora o prurido possa ser aliviado pelo ato de coçar, que geralmente está associado a uma sensação prazerosa, quando este se torna frequente ou intenso, comumente leva ao surgimento de lesões na pele e à liberação de mediadores que reforçam o processo inflamatório, induzindo ou agravando o prurido. Assim, um círculo vicioso é criado entre o prurido e o ato de coçar, conhecido como "*itch-scratch*

cycle". Como consequência, as regiões da pele afetadas pelo prurido podem apresentar sangramento, escoriações, ulcerações e crostas; todos, fatores que elevam o risco de infecções cutâneas. Ademais, a pele pode se tornar liquenificada (espessa), com desenvolvimento de hiperpigmentação, despigmentação ou formação de cicatrizes (Steinhoff et al., 2006, Metz et al., 2011, Liu e Ji, 2012).

O prurido pode ser localizado ou generalizado e sua intensidade pode variar de leve a severa. Também pode ser classificado de acordo com a sua duração, como agudo ou crônico. Este último, quando ocorre durante um período maior ou igual a seis semanas, segundo as recomendações do *International Forum for the Study of Itch* (IFSI) (Stander et al. 2007). O prurido crônico afeta negativamente os pacientes, na maioria das vezes perturbando o sono dos mesmos, contribuindo para o surgimento de distúrbios psicológicos como ansiedade, medo, dificuldade de concentração e depressão (Sheehan-Dare et al., 1990, Hashiro e Okumura, 1997, Patel et al., 2007, Chiang et al., 2011, Yosipovitch, 2011). Além disso, perturba a capacidade de trabalhar e afeta o relacionamento com a família e com a sociedade, podendo levar ao suicídio em casos extremos. O impacto do prurido crônico na qualidade de vida dos pacientes é comparável ao da dor crônica e tem sido sugerido que o primeiro seja reconhecido como uma doença por si só (Kini et al., 2011, Yosipovitch, 2011).

Em 2003, Twycross e colaboradores propuseram uma classificação da coceira de acordo com a sua origem, como: cutânea (pruriceptiva), neuropática, neurogênica ou psicogênica. No prurido pruriceptivo, a sensação é originada na pele, devido à inflamação, falta de hidratação ou outro dano, sendo que os terminais nervosos cutâneos são ativados por substâncias pruritogênicas. São exemplos, os pruridos

causados por urticária e as reações a picadas de insetos. O prurido neuropático é causado por lesão localizada em algum ponto ao longo da via aferente, podendo afetar tanto os nervos periféricos, quanto o sistema nervoso central (SNC). Esclerose múltipla, herpes zoster, prurido braquiorradial e tumores cerebrais são alguns exemplos de condições que têm como sintoma o prurido neuropático. Já o prurido neurogênico, é induzido por mediadores que possuem ação central, embora não haja evidências de lesão neuronal como, por exemplo, no prurido da colestase, onde ocorre a liberação de neuropeptídeos opioides que atuam nos receptores do tipo μ (MOP). Por último, o prurido psicogênico não raramente acompanha distúrbios psiquiátricos, tais como, transtorno obsessivo compulsivo, mania, psicose e delírio de parasitose (Twycross et al., 2003, Yosipovitch et al., 2003, Stander et al., 2007, Stander et al., 2008, Yosipovitch e Samuel, 2008).

Uma segunda classificação foi proposta por Ständer e colaboradores, em 2007, considerando os sintomas clínicos associados ao prurido. O grupo I é chamado de prurido na pele primeiramente inflamada, que ocorre em doenças cutâneas como dermatite atópica, psoríase, linfomas cutâneos, infecções e reações adversas a medicamentos. O grupo II é chamado de prurido na pele inicialmente não inflamada e, se manifesta sem a ocorrência de alterações visíveis na derme. Comumente, acompanha doenças sistêmicas, neurológicas ou psiquiátricas. Neste grupo, enquadra-se o prurido causado pela colestase, insuficiência renal crônica, diabetes, linfomas e tumores sólidos. O grupo III compreende pacientes com prurido crônico, que apresentam lesões cutâneas severas, secundárias ao ato de coçar, também crônico, como o que acontece no *prurigo nodularis*. A origem do prurido pode residir em doenças sistêmicas ou cutâneas, sendo que os pacientes podem apresentar prurido

crônico por anos (Stander et al., 2007, Metz et al., 2011). Existe ainda outro tipo de prurido que não se encaixa em nenhuma classificação aqui descrita. Popularmente, sempre se soube que as pessoas podem apresentar prurido quando veem imagens sugestivas, outras pessoas se coçando ou, quando falam sobre coceira. Mas foi apenas em 2000, que Niemeier e colaboradores publicaram o primeiro estudo demonstrando que o prurido pode ser induzido por estímulos visuais. Este fenômeno é chamado de “prurido contagioso” (Niemeier et al., 2000, Schut et al., 2015). Desde então, têm aumentado o interesse nessa área de estudo, mas ainda se sabe pouco sobre os mecanismos pelos quais o prurido pode ser “transmitido”. O que alguns pesquisadores sugerem é que este fenômeno ocorreria em estruturas superiores do SNC envolvendo o sistema de neurônios espelho no córtex pré-frontal (Papoiu et al., 2011).

A dermatite atópica e a psoríase são duas das doenças inflamatórias de pele mais comuns. Em países desenvolvidos, a dermatite atópica afeta 10-20% e a psoríase cerca de 2% da população. Ambas as condições são principalmente caracterizadas pela presença de prurido e geram, apenas nos EUA, um custo anual de 5 bilhões e 135 bilhões de dólares, respectivamente. (Guttman-Yassky et al., 2011, O'Neill et al., 2011, Boehncke e Schon, 2015, Brezinski et al., 2015). Ademais, o prurido crônico é uma desordem bastante comum, embora frequentemente menosprezada por profissionais da saúde, que afeta até 25% da população mundial durante algum período da sua vida. É mais comumente diagnosticado em mulheres e pacientes asiáticos e, encontra-se entre as 50 sequelas mais comuns de desfechos não fatais devido a doenças ou lesões, com uma prevalência de 4% da população global (~ 280 milhões de pessoas) (Vos et al., 2012, Mattered et al., 2013, Yosipovitch e Bernhard, 2013).

Diversas teorias têm sido apresentadas para explicar como a sensação de prurido é codificada. Com base em trabalhos do início do século 20, realizados por Von Frey (1922) e Lewis (1927), foi proposta a teoria da intensidade, onde se acreditava que os mesmos neurônios eram ativados tanto por estímulos pruriginosos, quanto por estímulos dolorosos. Assim, o prurido e a dor seriam diferenciados dependendo da intensidade do estímulo provocado. Ou seja, quando fracamente ativados, os neurônios gerariam sensação de prurido e, quando fortemente ativados produziram dor. No entanto, evidências contra esta teoria têm-se acumulado e fazem com que ela tenha se tornado insustentável, uma vez que, aumentando a intensidade de estímulos pruriginosos, não há transição para a percepção de dor. O mesmo ocorre quando intensidade de estímulos dolorosos é diminuída, uma vez que a dor não dá lugar ao prurido (McMahon e Koltzenburg, 1992, Patel e Dong, 2011).

Nas últimas décadas, muitos esforços foram realizados para tentar elucidar as bases neuronais da coceira. Apenas em 1997, Schmelz e colaboradores identificaram, em humanos, uma nova classe de fibras C com axônios particularmente finos e excessivas ramificações terminais, ativadas seletivamente por histamina e, condizentes com a sensação de prurido referida pelos pacientes. Estas fibras não-mielinizadas, insensíveis a estímulos mecânicos, com amplo território de inervação, alto limiar de ativação e baixa velocidade de condução (0,5 m/s), demonstraram propriedades distintas daquelas de nociceptores, sendo que compreendem 5% das fibras C aferentes na pele humana (Schmelz et al., 1997, Patel e Dong, 2010). Estes resultados sugeriram a existência de uma via específica para a transmissão do prurido, dando suporte à teoria da especificidade, que postula a ocorrência de um conjunto de fibras dedicadas exclusivamente à transmissão de prurido, denominadas pruriceptores (Patel e Dong,

2010). Além disso, há evidências para a existência de uma via de transmissão de prurido, independente de histamina.

A mucunaína, uma proteinase presente na planta tropical conhecida popularmente como mucunã ou pó-de-mico (*Mucuna pruriens*; em inglês *cowhage*), é capaz de gerar a sensação de prurido na ausência de eritema, um sintoma típico dos efeitos da histamina. Ademais, foi observado que há falha por parte dos anti-histamínicos em bloquear essa resposta, indicando que o *cowhage* induz prurido através de mecanismos não histaminérgicos (Johanek et al., 2007). Entretanto, trabalhos posteriores demonstraram que as fibras ativadas por histamina também respondem a estímulos nociceptivos, mesmo que com menor intensidade, como por exemplo, após a aplicação de agentes algogênicos, como capsaicina e bradicinina (BK) (Schmelz et al., 2003). Também foi visto que quando há inativação dos nociceptores que expressam o receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1), os camundongos têm uma redução importante em várias respostas pruriceptivas. Porém, as mesmas respostas não foram reproduzidas em animais com deleção gênica para este receptor. Com isso, este estudo propõe que as fibras que expressam TRPV1 são necessárias para a detecção do prurido, mas que o receptor em si não seria essencial (Imamachi et al., 2009). Esses e outros dados argumentam contra a teoria da especificidade, pelo menos ao nível periférico, pois indicam que os pruriceptores também detectam estímulos nociceptivos. Entretanto, ainda existe a possibilidade de que esta teoria seja aplicável ao nível central, especialmente no gânglio da raiz dorsal (DRG) (Patel e Dong, 2010).

A teoria da oclusão propõe que os pruriceptores, dentro do grupo dos neurônios nociceptivos, podem constituir um subconjunto seletivo para a transmissão pruriginosa. Este subconjunto poderia gerar a sensação de prurido quando ativado; porém, se um grande grupo de nociceptores é recrutado por um estímulo nocivo, isso levaria ao bloqueio (ou oclusão; Figura 1) da resposta pruriceptiva, para produzir dor. Esta teoria explicaria as similaridades entre prurido e dor, bem como a sua relação antagônica (Patel e Dong, 2011).

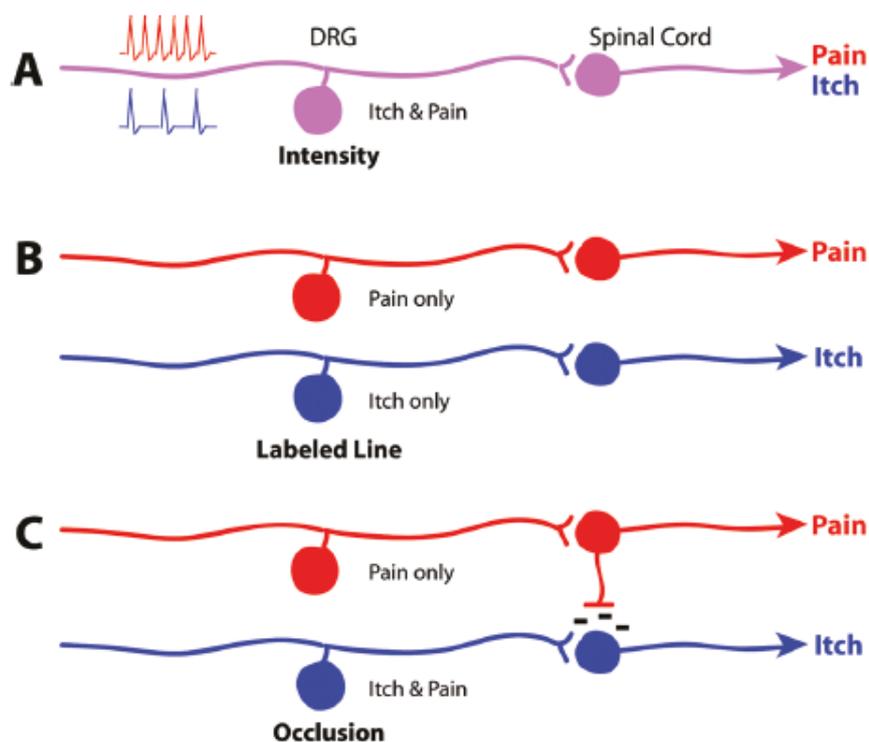


Figura 1. Modelos propostos para a transmissão de prurido. (A) A teoria da intensidade propõe que neurônios transmitem prurido ou dor, dependendo, se o estímulo é de baixa ou de alta intensidade, respectivamente. (B) A teoria da especificidade propõe fibras e circuitos completamente separados para a detecção de dor e prurido. (C) A teoria da oclusão propõe que um grupo de neurônios dentro dos nociceptores transmite prurido quando seletivamente ativado por estímulos pruriginosos. Os estímulos nocivos levariam à ativação do grande grupo de fibras e isso inibiria a sensação do prurido. Retirada de Patel e Dong, 2011 (Patel e Dong, 2011)

A informação pruriginosa é transmitida pelos pruriceptores via gânglio da raiz dorsal (DRG) até a medula espinhal. Ali, essas fibras fazem sinapse com neurônios localizados na lâmina I do corno dorsal. Estes neurônios atravessam para o lado contralateral da medula espinhal, se projetam para o tálamo e, de lá para o córtex sensoriomotor ou, para o córtex cingulado. O envolvimento do córtex motor explica o impulso de coçar, dependente da percepção desagradável de prurido. Já, a ativação do córtex cingulado anterior, uma estrutura relacionada ao processamento emocional, explica o componente afetivo da sensação de prurido (Wallengren, 2005, Steinhoff et al., 2006).

Dois mecanismos envolvidos durante os processos pruriceptivos são a sensibilização periférica e a sensibilização central. A sensibilização periférica é caracterizada pelo surgimento de hipersensibilidade, devido à liberação de mediadores inflamatórios que facilitam a redução do limiar de ativação e, aumentam a capacidade de resposta dos nociceptores. Estes aspectos estão mais frequentemente relacionados a condições agudas ou “sub-crônicas”. Já, a sensibilização central está envolvida no desenvolvimento de prurido crônico, onde ocorrem mudanças nas propriedades dos neurônios no SNC (plasticidade), aumento no estado funcional de neurônios e circuitos, aumento na excitabilidade de membrana e eficácia sináptica e/ou, diminuição de controles inibitórios. Dois fenômenos são característicos da sensibilização central no prurido: a alopcinesia (do grego antigo “*allos*”- outro; “*kinesis*”- movimento) e a hiperpcinesia (do grego antigo “*hupér*”- sobre, acima, excesso; “*kinesis*”- movimento). A alopcinesia é um prurido que resulta de um estímulo inócuo, que normalmente não provoca prurido. A hiperpcinesia é observada quando um estímulo pruriginoso causa uma sensação de coceira muito mais intensa. Assim, a

alocinesia e a hipercinesia seriam equivalentes aos fenômenos nociceptivos conhecidos como alodinia e hiperalgesia, respectivamente (Ji et al., 2003, Akiyama et al., 2012).

Acredita-se que substâncias pruritogênicas ativam neurônios sensoriais primários, gerando a sensação de prurido de modo direto, isto é, por ativação de receptores expressos nas fibras aferentes ou, de modo indireto, via ativação de tipos celulares secundários, como por exemplo, mastócitos ou queratinócitos que liberam substâncias que ativam essas fibras (Patel e Dong, 2011).

Uma grande variedade de mediadores e receptores que induzem o prurido tem sido identificada nas últimas décadas. No entanto, os seus mecanismos na patofisiologia do prurido ainda não são muito bem entendidos. Atualmente, a histamina ainda é a substância pruritogênica mais conhecida e estudada. Ela se liga ao seu receptor H1 (H1R) e sensibiliza TRPV1 via fosfolipase C (PLC) (Han et al., 2006, Jeffry et al., 2011, Metz et al., 2011). Existem ainda evidências acerca da relevância dos receptores de histamina H4 (H4R), nos processos pruriginosos (Potenzieri e Undem, 2012). Diversas substâncias indutoras de prurido e seus receptores têm sido estudados com maior intensidade, como por exemplo, a endotelina-1 (ET-1) e o receptor ET_A, cloroquina (CQ) e o MrgprA3, triptase e o PAR-2 e, IL-31 e o IL-31R. Além disso, receptores, como o B₁R e B₂R para cininas, parecem desempenhar um papel importante na sinalização da resposta pruriceptiva envolvendo ativação de PAR-2. O PAR-4 é outro receptor responsável por mediar a sensação de prurido. Recentemente, foi demonstrado que a ativação de PAR-4 em neurônios sensoriais cutâneos, e talvez em células não neuronais da pele, pode levar à ativação TRPV1 e do receptor de

potencial transitório anquirina tipo 1 (TRPA1), com a possível liberação dos neuropeptídeos substância P (SP) e do peptídeo liberador de gastrina (GRP) (Costa et al., 2010, Patel e Dong, 2011, Han et al., 2012, Potenziari e Undem, 2012, Patricio et al., 2015).

O receptor para o peptídeo liberador de gastrina (GRPR) foi descoberto como sendo crucial na detecção do prurido, o que poderia sugerir a possibilidade de que este receptor e, os neurônios que o expressam, sejam apontados como uma via específica para a transmissão da informação pruriceptiva (Davidson e Giesler, 2010). Ademais, Liu e Ji (2012) demonstraram que o estresse oxidativo, presente em diversas condições como doença renal crônica, psoríase, dermatite atópica, diabetes e colestase, é capaz de induzir o comportamento de coçar através da ativação de TRPA1, por mecanismos independentes da histamina. Estes achados sugerem que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo alternativo para a transmissão de prurido (Liu e Ji, 2012). A linfopoetina estromal tímica (TSLP) é uma citocina predominantemente expressa em células epiteliais cutâneas (queratinócitos), pulmonares e intestinais, altamente associada a diversas doenças inflamatórias, como dermatite atópica e asma. Wilson e colaboradores (Wilson et al., 2013) descreveram que a TSLP liberada por queratinócitos, liga-se ao seu receptor (TSLPR) expresso nos terminais livres e ativa diretamente os neurônios sensoriais que inervam a pele, induzindo prurido (Wilson et al., 2013). Outros receptores como o 5-HT_{1A} e o HTR₇ para serotonina (5-HT), o Toll-like do tipo 3 (TLR3) e o Toll-like do tipo 7 (TLR7) para reconhecimento de patógenos também têm sido apontados como importantes componentes na transmissão do prurido (Liu et al., 2010, Liu et al., 2012, Zhao et al., 2014a, Morita et al., 2015). Além da descoberta de diversos tipos de mediadores e receptores que induzem a sensação

de prurido, interneurônios e peptídeos endógenos inibitórios também têm sido apontados como relevantes na modulação das respostas pruriginosas (Ross et al., 2010, Kardon et al., 2014).

O manejo do prurido agudo severo, bem como do prurido crônico, representa um processo bastante complexo, sendo que as sensações relacionadas causam um sofrimento que não pode ser aliviado facilmente. Apesar dos avanços realizados recentemente, ainda não existem fármacos antipruriginosos específicos. O tratamento padrão disponível atualmente é composto por anti-histamínicos de uso sistêmico ou corticoides de uso tópico. Infelizmente, o tratamento com esses agentes é limitado e, quase sempre, ineficaz (Chiang et al., 2011, Patel e Dong, 2011, Tey e Yosipovitch, 2011, LaMotte et al., 2014). Assim, um melhor entendimento sobre a patofisiologia do prurido e seus mecanismos de transmissão é ainda necessário para o desenvolvimento de novas terapias para este antigo problema.

1.2. O Peptídeo Liberador de Gastrina e seu Receptor

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) foi o primeiro peptídeo similar à bombesina (Bn, peptídeo isolado da pele do sapo *Bombina bombina*) identificado em mamíferos (Jensen et al., 2008). Foi originalmente isolado a partir do estômago de suínos por McDonald e colaboradores em 1979, sendo formado por 27 aminoácidos. Compartilha os mesmos sete aminoácidos C-terminais com a Bn, o que explica suas atividades biológicas similares (McDonald et al., 1979, Jensen et al., 2008). O gene humano para o GRP encontra-se no cromossomo 18q21. Este peptídeo é sintetizado na forma de uma molécula precursora, o pré-pró-GRP. O mesmo é clivado por uma

peptidase sinalizadora, dando origem ao pró-GRP, que é processado por clivagem proteolítica e forma o GRP (Merali et al., 1999, Gonzalez et al., 2008). O GRP e seu RNAm são amplamente distribuídos no SNC e nos tecidos periféricos, principalmente no trato gastrointestinal (TGI) de mamíferos (Jensen et al., 2008). Seus efeitos biológicos estão relacionados a uma série de funções, tanto de eventos fisiológicos, quanto patológicos (Weber, 2009, Majumdar e Weber, 2011). Este peptídeo exerce seus efeitos através da ligação ao seu receptor, o GRPR (também conhecido como BB₂), um típico receptor acoplado à proteína G (GPCR), com sete domínios transmembrana, constituído de 384 aminoácidos (Gonzalez et al., 2008). O GRPR sinaliza, principalmente, através de vias intracelulares relacionadas com a ativação da fosfolipase C (PLC), levando a mobilização de cálcio intracelular e ativação de proteína quinase C (PKC) (Gonzalez et al., 2008, Weber, 2009). Sua dessensibilização ocorre por internalização mediada por arrestinas e clatrininas, sendo posteriormente reciclado de volta para a membrana celular (Jensen et al., 2008).

A ativação do GRPR é responsável por efeitos fisiológicos como liberação de hormônios gastrintestinais, contração de musculatura lisa, regulação do ritmo circadiano, controle da saciedade, termo-regulação, ansiedade, modulação de memória e crescimento celular. O GRPR também participa de processos patológicos incluindo doenças pulmonares e condições inflamatórias. Tem sido descrito que a estimulação de GRPR promove o crescimento e a diferenciação celular em vários tipos de tumores e parece colaborar para a capacidade invasiva dos mesmos (Patel et al., 2006, Jensen et al., 2008, Weber, 2009, Czepielewski et al., 2012). Recentemente, o GRP tem sido associado com a sensação de prurido (Majumdar e Weber, 2011). Um estudo realizado por Sun e Chen (2007) demonstrou que o GRP é co-expresso com o

peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e com a substância P (SP) em um subconjunto de fibras de pequeno e médio calibre do DGR de camundongos, e, o GRPR é expresso na lâmina I do corno dorsal da medula espinhal (Sun e Chen, 2007). Estes autores utilizaram animais *knockout* (KO) para GRPR a fim de investigar se este receptor seria necessário para a transmissão de prurido. Foi avaliado o comportamento de coçar após a injeção intradérmica (i.d.) de agentes pruritogênicos em animais selvagens e *knockouts*. Os animais com deleção gênica do GRPR demonstraram uma diminuição significativa do comportamento de coçar após a injeção de composto 48/80 (degranulador de mastócitos para liberação de histamina), do agonista seletivo de PAR-2 ou de cloroquina, em relação aos animais selvagens. Ademais, os autores observaram que a injeção intratecal (i.t.) de GRP foi capaz de induzir um intenso comportamento de coçar em animais selvagens. De forma interessante, a injeção i.t. do antagonista de GRPR, o (D-Phe-6-Bn(6-13)OMe, reduziu significativamente os acessos de coceira, tanto após a administração de GRP i.t., quanto após a administração i.d. dos agentes pruritogênicos anteriormente citados (Sun e Chen, 2007). Mais tarde, Sun e colaboradores (2009) depletaram neurônios GRPR⁺ da medula espinhal de camundongos e viram que o comportamento de coçar foi praticamente abolido após a injeção i.d. de substâncias como histamina, composto 48/80, serotonina, endotelina-1, agonista de PAR-2 e cloroquina (Sun et al., 2009). Ambos os estudos foram decisivos para uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados ao prurido e, mostraram, pela primeira vez, que a deleção do GRPR ou o bloqueio farmacológico de sua atividade não interferiram na transmissão nociceptiva, fornecendo evidências para uma via de sinalização específica para o prurido. Sabe-se também que o GRPR e a isoforma 1D do receptor opioide μ (MOR1D) formam

heterodímeros na lâmina I da medula espinhal e são responsáveis por mediar o prurido induzido por opioides, sem efeito sobre seus efeitos analgésicos (Liu et al., 2011). Mais uma vez, estes dados apontam o GRPR como uma molécula “prurido-específica”.

Cresce cada vez mais a busca pela identificação das vias de sinalização intracelulares ativadas pelo sistema GRP/GRPR em diversos sistemas e condições patológicas. Foi demonstrado que o GRP é capaz de ativar a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) em células de neuroblastoma humano, o que estaria associado com a progressão do ciclo celular. Um estudo recente mostrou que o GRP tem efeitos quimioatrativos sobre neutrófilos, por mecanismos dependentes da ativação de fosfolipase C β 2 (PLC- β 2), PI3K e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs): quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e p38 (Ishola et al., 2007, Czepielewski et al., 2012). No entanto, ainda faltam estudos acerca das vias de sinalização responsáveis pela transmissão pruriceptiva mediada pelo GRP.

1.3. A fosfatidilinositol-3-quinase γ

As fosfatidilinositol-3-quinases (PI3Ks) são um grupo de enzimas evolutivamente conservadas (Engelman et al., 2006). Elas fosforilam (adicionam um grupo fosfato) o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) na porção 3'-OH do anel inositol do fosfatidilinositol e fosfoinositídeos, produzindo o segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato (PIP₃), um processo necessário para a que ocorra a translocação da serina/treonina quinase Akt (também conhecida como PKB) do citosol para a membrana plasmática. Uma vez que Akt se liga ao PIP₃ na camada interior da membrana, ela precisa ser fosforilada em dois sítios para sua completa ativação,

primeiro no resíduo treonina 308 pela proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos 1 (PDK1) e depois no resíduo serina 473 pela mTORC2. Quando ativada, a Akt medeia respostas celulares como proliferação, sobrevivência, motilidade e metabolismo (Zhuang et al., 2004, Ohashi e Woodgett, 2005, Kong e Yamori, 2007, Rommel et al., 2007, Marone et al., 2008, Roy et al., 2009).

A família das PI3Ks é dividida em três classes (I, II e III). A classe I é formada por heterodímeros constituídos de uma subunidade regulatória e uma subunidade catalítica. Por sua vez, a classe I é subdividida em duas: IA e IB. A subclasse IA é composta pelas isoformas PI3K α , PI3K β e PI3K δ , e sinalizam via receptores tirosina-quinase pela ligação de hormônios, fatores de crescimento, citocinas, integrinas e outros estímulos extracelulares. A subclasse IB apresenta apenas um membro, a isoforma PI3K γ , um complexo formado por uma subunidade regulatória p101 ou p84 e uma subunidade catalítica p110 γ (Hawkins e Stephens, 2015). A PI3K γ é ativada por receptores acoplados à proteína G. Inicialmente localizada no citosol, a PI3K γ é recrutada até a membrana pela subunidade $\beta\gamma$ das proteínas G, lá ocorre a ligação da mesma com uma das subunidades regulatórias (Figura 2). A G $\beta\gamma$ também interage diretamente com subunidade catalítica, promovendo uma mudança conformacional e consequente ativação da PI3K γ (Brock et al., 2003). A ativação pela G $\beta\gamma$ e a interação com esta é mais pronunciada para o complexo p110 γ -p101 do que p110 γ -p84 (Vadas et al., 2011).

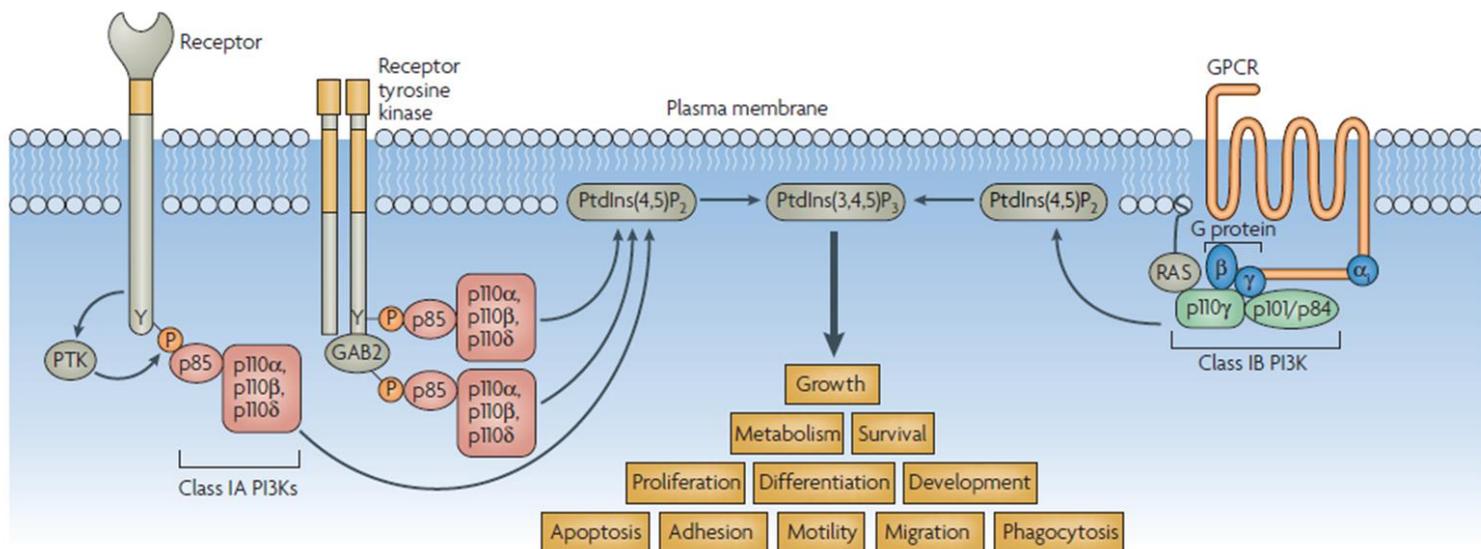


Figura 2. Mecanismos de ativação da classe I de PI3Ks, responsáveis por uma série de respostas celulares. PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂), PtdIns(3,4,5)P₂ (PIP₃), GPCR (receptor acoplado à proteína G). Retirada de Rommel *et al.*, 2007 (Rommel *et al.*, 2007).

As isoformas α e β de PI3K são expressas em todas as células e regulam várias funções, incluindo sobrevivência e proliferação celular. Assim como a PI3K δ , a PI3K γ é expressa em leucócitos e regula respostas imunológicas (quimiotaxia de leucócitos e degranulação de mastócitos). No entanto, esta última também pode ser encontrada no endotélio, coração, cérebro e em neurônios nociceptivos do DRG (Ohashi e Woodgett, 2005, Pomel *et al.*, 2006, Ruckle *et al.*, 2006, Ferrandi *et al.*, 2007, Fröjdö *et al.*, 2007, Rommel *et al.*, 2007, Ito *et al.*, 2007, Leinders *et al.*, 2014). O aumento constitutivo da sinalização das PI3Ks pode ter efeito deletério nas células, levando ao descontrole da proliferação, migração facilitada e adesão independente de crescimento. Estes eventos favorecem não apenas a formação de tumores malignos, mas também o desenvolvimento de inflamação crônica, alergias, diabetes, problemas cardiovasculares e doenças autoimunes (Ito *et al.*, 2007, Marone *et al.*, 2008, Gharbi *et al.*, 2007).

A inibição da PI3K γ constitui um novo conceito para o controle de doenças como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, esclerose múltipla,

Alzheimer, aterosclerose e alergias; condições estas onde se sabe que a enzima está desregulada. Anteriormente, o nosso grupo demonstrou que a PI3K γ , além de participar de processos inflamatórios, também está envolvida em respostas pruriceptivas. Assim, fármacos que tem como mecanismo de ação o bloqueio da PI3K γ apresentam grande potencial terapêutico (Wymann et al., 2003, Barber et al., 2005, Camps et al., 2005, Ruckle et al., 2006, Ferrandi et al., 2007, Fougerat et al., 2008, Passos et al., 2010, Rodrigues et al., 2010, Pereira et al., 2011, Roller et al., 2012).

No início da década de 90, começaram a ser desenvolvidos os inibidores sintéticos da PI3K de primeira geração. O primeiro a ser sintetizado foi o LY294002 (2-(4-morfolinil)-8-fenil-4*H*-1-benzopirano-4-ona hidrocloreto), um inibidor reversível derivado da quercetina, um flavonol encontrado em frutas e vegetais como maçãs, cerejas, uvas vermelhas e cebolas. As propriedades biofarmacêuticas desfavoráveis destes inibidores de primeira geração e, a falta de seletividade para as diferentes isoformas, estimularam a procura de moléculas mais seletivas, principalmente para a isoforma PI3K γ , que representa um alvo farmacológico importante e promissor para o tratamento de doenças inflamatórias (Pomel et al., 2006, Ferrandi et al., 2007, Ito et al., 2007, Marone et al., 2008, Gharbi et al., 2007). Como inibidores da PI3K de segunda geração, diversos compostos têm sido identificados, sendo ativos de forma seletiva contra várias PI3Ks e fundamentais para explorar a importância destas enzimas (Marone et al., 2008).

O AS605240 (5-(6-quinoxalilmetileno)-2,4-tiazolidina-2,4-diona) é um inibidor do sítio de ligação da adenosina trifosfato (ATP), de baixo peso molecular, seletivo para PI3K γ , ativo por via oral, bastante potente, que tem ótimas propriedades de permeabilidade celular (Camps et al., 2005). Foi demonstrado que a inibição da PI3K γ ,

através da utilização do AS605240, bloqueia a progressão de dano e inflamação nas articulações, em modelos de artrite reumatoide em camundongos e, aumenta a sobrevivência de camundongos num modelo de lupus eritematoso sistêmico, diminuindo a deposição de imunocomplexos, proteinúria e níveis de auto-anticorpos (Barber et al., 2005, Camps et al., 2005). Em ambos os estudos, efeitos adversos ao tratamento não foram observados. Outros dados da literatura mostram dados relevantes sobre os efeitos benéficos do AS605240 em diversos modelos experimentais. Dentre os mais recentes, cabe destacar a redução de inflamação neutrofílica e eosinofílica, respectivamente, em modelos de asma e fibrose cística, redução da hiperplasia da camada íntima vascular, redução da pressão sanguínea e indução de vaso relaxamento, redução da desmielinização e alterações celulares no SNC em um modelo de esclerose múltipla e, diminuição e reversão de complicações associadas ao diabetes (Azzi et al., 2012, Carnevale et al., 2012, Comerford et al., 2012, Saito et al., 2014, Smirnova et al., 2014, Galluzzo et al., 2015). De forma interessante, foi descrito previamente por nosso grupo de pesquisa, que a inibição seletiva de PI3K γ é capaz de reduzir significativamente o comportamento de coçar induzido por tripsina e, de forma menos intensa, o prurido causado por composto 48/80 (Pereira et al., 2011).

Como a PI3K γ é ativada *downstream* GPCRs e está envolvida em respostas pruriceptivas, o desenvolvimento do presente estudo foi baseado na hipótese de que, ao menos no contexto do prurido, o GRPR sinaliza através da via da PI3K γ /Akt, após ser ativado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o envolvimento da enzima PI3K γ nas respostas pruriceptivas mediadas pelo sistema GRP/GRPR, a nível espinhal, assim como a possível interação destas vias com outros mecanismos envolvidos no prurido.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos do GRP sobre a ativação direta de neurônios aferentes e caracterizar as células responsivas através de imagem de cálcio em cultura de células do gânglio da raiz dorsal (DRGs), avaliando os efeitos do bloqueio farmacológico do GRPR.
- Determinar a capacidade do GRP em induzir a despolarização e o disparo de potencial de ação em nociceptores utilizando a técnica de *patch-clamp*.
- Avaliar a especificidade do GRPR em mediar respostas pruriceptivas, em relação a respostas nociceptivas em camundongos.
- Analisar *ex vivo*, as vias de sinalização ativadas pelo GRP, com especial foco na via PI3K γ /Akt, em medulas de camundongos, através de citometria de fluxo.
- Determinar a ativação da via PI3K γ /Akt em células HEK293 transfectadas ou não com o GRPR após a incubação com GRP por meio de *Western Blotting*.
- Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico de PI3K γ ou GRPR, sobre o comportamento de coçar causado pela ativação do receptor GRPR em modelos de prurido agudo e crônico em camundongos.

- Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico para GRPR, sobre o comportamento de coçar causado por outras substâncias pruritogênicas em camundongos.
- Investigar a expressão de Akt fosforilada e a sua co-localização com o GRPR na medula espinhal, por imunofluorescência, após a indução de prurido crônico em camundongos.
- Investigar os níveis de expressão do receptor GRPR na medula espinhal após a indução do comportamento de coçar agudo e crônico, por meio de PCR em tempo real.
- Analisar a expressão de Akt fosforilada em DRGs de camundongos com prurido crônico e determinar a população celular envolvida: inflamatória ou neuronal, utilizando citometria de fluxo.
- Investigar a capacidade da ativação espinhal de Akt em induzir o comportamento de coçar em camundongos.

Capítulo II

3. Manuscrito publicado no periódico *Journal of Neuroscience*. Dezembro de 2015.

“GRPR/PI3K γ : Partners in Central Transmission of Itch”

GRPR/PI3K γ : Partners in Central Transmission of Itch

Paula J.S. Pereira,^{1,3,6} Gustavo D.B. Machado,^{2,3*} Giuliano M. Danesi,^{2,3*} Francesca F. Canevese,^{2,3} Vemuri B. Reddy,⁶ Talita C.B. Pereira,⁴ Maurício R. Bogo,^{1,3} Yung-Chih Cheng,⁷ Cedric Laedermann,⁷ Sébastien Talbot,⁷ Ethan A. Lerner,⁶ and Maria M. Campos^{3,4,5}

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, ²Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde, ³Instituto de Toxicologia e Farmacologia, ⁴Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, and ⁵Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil, ⁶Cutaneous Biology Research Center, Department of Dermatology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02114, and ⁷F.M. Kirby Neurobiology Center, Children's Hospital Boston, Boston, Massachusetts 02115

The gastrin-releasing peptide (GRP) and its receptor (GRPR) are important components of itch transmission. Upstream, but not downstream, aspects of GRPR signaling have been investigated extensively. We hypothesize that GRPR signals in part through the PI3K γ /Akt pathway. We used pharmacological, electrophysiological, and behavioral approaches to further evaluate GRPR downstream signaling pathways. Our data show that GRP directly activates small-size capsaicin-sensitive DRG neurons, an effect that translates into transient calcium flux and membrane depolarization (~ 20 mV). GRPR activation also induces Akt phosphorylation, a proxy for PI3K γ activity, in *ex vivo* naive mouse spinal cords and in GRPR transiently expressing HEK293 cells. The intrathecal injection of GRP led to intense scratching, an effect largely reduced by either GRPR antagonists or PI3K γ inhibitor. Scratching behavior was also induced by the intrathecal injection of an Akt activator. In a dry skin model of itch, we show that GRPR blockade or PI3K γ inhibition reversed the scratching behavior. Altogether, these findings are highly suggestive that GRPR is expressed by the central terminals of DRG nociceptive afferents, which transmit itch via the PI3K γ /Akt pathway.

Key words: AS605240; dry skin; GRPR; itch; PI3K γ ; spinal cord

Significance Statement

Itch is the most common symptom of the skin and is related to noncutaneous diseases. It severely impairs patients' quality of life when it becomes chronic and there is no specific or effective available therapy, mainly because itch pathophysiology is not completely elucidated. Our findings indicate that the enzyme PI3K γ is a key central mediator of itch transmission. Therefore, we suggest PI3K γ as an attractive target for the development of new anti-pruritic drugs. With this study, we take a step forward in our understanding of the mechanisms underlying the central transmission of itch sensation.

Introduction

Itch is defined as an unpleasant sensation and emotional experience that leads to the desire or reflex to scratch (Ikoma et al., 2006). It is a recurring symptom and is a feature of both skin and systemic disorders, including chronic kidney and liver diseases, viral infections, diabetes, neurologic conditions, and certain cancers (Weisshaar and Dalgard, 2009; Davidson and Giesler, 2010). Chronic itch is a major

burden that significantly affects the quality of life of patients to an extent comparable to that of chronic pain (Kini et al., 2011). Although itch and pain share nerve fibers and mechanistic and molecular overlap, their respective sensation differs (Ross, 2011). Like pain, itch remains poorly controlled and largely unresponsive to currently available pharmacotherapies (LaMotte et al., 2014). A better understanding of the pathophysiology of itch and its mechanisms of transmission is essential for the development of new therapies for this old problem.

Gastrin-releasing peptide (GRP) is a 27 aa neuropeptide widely distributed in the CNS and peripheral tissues (Majumdar

Received June 16, 2015; revised Nov. 4, 2015; accepted Nov. 11, 2015.

Author contributions: P.J.S.P., S.T., E.A.L., and M.M.C. designed research; P.J.S.P., G.D.B.M., G.M.D., F.F.C., V.B.R., T.C.B.P., M.R.B., Y.-C.C., C.L., and S.T. performed research; P.J.S.P., G.D.B.M., G.M.D., F.F.C., Y.-C.C., C.L., S.T., and M.M.C. analyzed data; P.J.S.P., T.C.B.P., M.R.B., Y.-C.C., C.L., S.T., E.A.L., and M.M.C. wrote the paper.

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Grant FAPERGS/2012-2525-0 to M.M.C.), the National Institutes of Health (Grants R01AR057744 and R21AR067399 to E.A.L.), the Canadian Institute of Health and Research (S.T.), and the Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, sponsored by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (P.J.S.P.). M.M.C. is a research career awardee of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil. We thank Rafael F. Zanin and Tuanlian Luo for their respective assistance with flow cytometry and technical input.

The authors declare no competing financial interests.

*G.D.B.M. and G.M.D. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to either of the following: Dr. Maria M. Campos, Institute of Toxicology and Pharmacology and School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil, E-mail: maria.campos@puccs.br or camposmartha@yahoo.com; or Dr. Ethan A. Lerner, Cutaneous Biology Research Center, Department of Dermatology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02114, E-mail: elerner@partners.org.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2310-15.2015

Copyright © 2015 the authors 0270-6474/15/3516272-10\$15.00/0

and Weber, 2011). The effects of GRP are known to be mediated by the GRP receptor (GRPR), a G_{αq}-protein-coupled receptor that classically signals via phospholipase C (PLC), leading to calcium mobilization and activation of the protein kinase C (Jensen et al., 2008). GRPR activation is implicated in several physiological responses, including smooth muscle contraction, hormone secretion, circadian rhythm regulation, satiety control, memory modulation, and cell growth (Gonzalez et al., 2008). This receptor is also involved in pathological states including pulmonary diseases, inflammatory conditions, and tumor growth (Jensen et al., 2008; Czepielewski et al., 2012). Sun and Chen (2007) reported that intrathecal injection of GRP induces robust and transient scratching behavior in mice, an effect absent in GRPR knock-out mice. The authors also showed that, when pruritogens were injected intradermally, GRPR mutant mice scratched significantly less compared with wild-type animals. Pain sensitivity was not compromised in GRPR mutant mice, suggesting that GRPR was an itch-specific signaling molecule in the spinal cord. GRPR continues to be the focus of numerous itch-related studies, most of which focus on upstream mechanisms and mediators, whereas the intracellular events and downstream signaling pathways have largely been overlooked, a topic that we address here.

PI3K γ belongs to a group of highly conserved lipid kinases that participate in the intracellular signaling cascade by phosphorylating the 3'-hydroxyl ring of phosphatidylinositol and phosphoinositides, generating the second messenger PIP₃, an essential step for the serine/threonine kinase Akt activation (Engelman et al., 2006). PI3K γ has been shown to be deregulated in many disease models, including arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, multiple sclerosis, Alzheimer's disease, atherosclerosis, and allergy (Wymann et al., 2003; Barber et al., 2005; Camps et al., 2005; Fougerat et al., 2008; Passos et al., 2010; Rodrigues et al., 2010; Roller et al., 2012). We have previously reported that PI3K γ inhibition reduces trypsin-induced scratching behavior in mice, indicating that this enzyme is involved in itch transmission (Pereira et al., 2011). Because PI3K γ is activated downstream of GPCRs and is related to itch, we hypothesized that, in the context of pruritus, PI3K γ would be activated after GRPR stimulation.

Here, we used a combination of electrophysiological, pharmacological, behavioral, and molecular studies to demonstrate that central GRPR is a mediator of acute and chronic itch, signaling through the PI3K γ /Akt pathway, and that PI3K γ can be targeted pharmacologically to relieve GRPR-mediated itch.

Materials and Methods

Animals. Male Swiss and CD-1 mice were purchased from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas and Charles River Laboratories, respectively. Mice were 25–30 g, 4–8 per group, according to the experimental protocol. They were housed under standard environmental conditions of temperature (22 ± 2°C), light (12 h light-dark cycle), and humidity (50–70%), with food and water provided *ad libitum*. Procedures performed followed the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983) and were approved by the Institutional Animal Ethics Committee for the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul and by the Institutional Animal Care and Use Committee for the Massachusetts General Hospital (13/00338 and 2012N000037, respectively). Mice were habituated to the laboratory for at least 1 h before experiments.

DRG culture and calcium imaging. Cervical to lumbar dorsal root ganglia (DRG) from mice were dissected and maintained in DMEM (Invitrogen) containing 200 mM L-glutamine (Fisher Scientific), 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen), and 5000 U/ml penicillin and 5000 μg/ml streptomycin (Fisher Scientific). Enzymatic digestion was per-

formed with 1 mg of collagenase in 1 ml of dispase (Roche) at 37°C for 70 min. The collagenase/dispase solution was removed and DRG were washed and resuspended in DMEM containing 125 U DNase (Sigma-Aldrich) within which the ganglia were mechanically triturated using fire-polished glass pipettes. Cells were centrifuged over a 10% BSA solution (Sigma-Aldrich) gradient, pelleted, and resuspended in neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with B27 (Invitrogen), nerve growth factor (Invitrogen), glial cell-derived neurotrophic factor (Sigma-Aldrich), and arabinocytidine (Sigma-Aldrich). Cells were plated onto glass-bottom 35 mm dishes coated with 10 μg/ml laminin (Sigma-Aldrich) and cultured for 24 h.

For calcium imaging experiments, neurons were loaded for 30 min with 10 μM Fura-2 AM (Invitrogen) in neurobasal medium, washed with standard extracellular solution containing the following (in mM): 145 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucose, and 10 HEPES, pH 7.5, and imaged at room temperature. Cells were evaluated using a Nikon Eclipse Ti inverted microscope equipped with an Exi Aqua CCD camera (QImaging). Ca²⁺ flux fluorescence was measured as an absorbance ratio at 340 and 380 nm (F340/F380) (Lambda DG4; Sutter Instruments). The 340/380 ratiometric images were analyzed using Nikon Elements AR software. Serotonin (5-HT, 3–300 μM), chloroquine (CQ, 0.1–100 μM), SLIGRL-NH₂ (SLIGRL, 0.1–100 μM), gastrin-releasing peptide (GRP, 0.001–1 μM) were all from Sigma-Aldrich. GRPR antagonists (RC-3095 and PD176252, 1 μM) were from Adooq Bioscience and Tocris Bioscience, respectively. The solutions were delivered directly onto neurons at a flow rate at 2 ml/min for 20 s using perfusion barrels followed by buffer washout and further application. After applications of ligands, 1 μM capsaicin (Tocris Bioscience) and/or 40 mM KCl (Sigma-Aldrich) were applied at the end of each experiment. The criteria to determine a positive response to each compound was a raise in fluorescence (F340/F380) of 20 percent above baseline (average fluorescence recorded during the first 60 s of each dish).

Current-clamp recordings. At 48/72 h after plating, only small cells (<25 μm) that responded to GRP in calcium imaging experiment were recorded in whole-cell mode. A multiclamp 700B amplifier, digidata 1440a digitizer and Clampex software (Molecular Devices) were used for recordings. Data were sampled at 10 kHz. Pipettes were pulled from thick-walled borosilicate glass capillaries on a Sutter Instruments P-97 and had a resistance < 3 MΩ when filled with the pipette solution. Capacity transients were canceled and series resistance was compensated at ~80%. After obtaining whole-cell configuration, cells were held at -60 mV for 3 min to allow equilibrium and only cells that had stable and low-access (generally 5 MΩ, always <10 MΩ) resistance throughout the whole protocol were analyzed. Membrane potential was corrected for liquid junction potential (-15 mV). Pipette solution contained the following (in mM): 135 K gluconate, 10 KCl, 1 MgCl₂, 5 EGTA, and 10 HEPES, 300 mOsm and pH 7.3. Standard external solution was obtained from Boston BioProducts and contained the following (in mM): 145 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 glucose, and 10 HEPES, pH 7.4.

Pain assessment. Mouse thermal latency threshold was assessed using the Hargreaves' test (Plantar Test Apparatus; Ugo Basile) 10 min after an acute capsaicin (100 μM; prepared in DMSO) injection into their left hindpaw (Caterina et al., 2000). Separate groups of mice were coinjected with capsaicin (100 μM) and RC-3095 (1 nmol/paw) or PD176252 (1 nmol/paw). The control group received the respective vehicle (DMSO).

Flow cytometry analysis. Lumbar spinal cords from mice were harvested and digested using 2 ml of RPMI medium with 2% FBS and collagenase. Cells were stimulated with GRP (0.001–0.1 μM) or saline solution for 5 and 30 min at 37°C. In some cases, the cells were preincubated with the GRPR antagonist PD176252 (10, 30, and 100 μM) or the selective PI3K γ inhibitor AS605240 (0.003, 0.01, and 0.03 μM) for 15 min before adding GRP. The cells were then fixed in Phosflow Buffer I for 10 min at 37°C, washed, and permeabilized with Phosflow Perm Buffer II for 30 min on ice. Cells were then either stained with A488 anti-phospho-p38 (catalog #612594; BD Biosciences), PE anti-phospho-Akt (catalog #560378; BD Biosciences), and APC anti-phospho-ERK1/2 (catalog #17-9109-41; eBioscience). Experiments were processed on a FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (TreeStar).

Western blot analysis for GRPR, p-Akt, and total-Akt. For this set of experiments, mouse GRPR cDNA was cloned as a XhoI-HindIII fragment into the pcDNA3.1 (–)hygro plasmid vector. Human embryonic kidney cells (HEK293; ATCC CRL-1573) were transfected with the GRPR plasmid DNA. HEK293 cells transfected with pcDNA3.1 (–) vector only were used as a control. Forty-eight hours after transfection, the cells were rinsed with PBS three times. Transfected HEK293 cells were incubated with either GRP (10 and 100 nM) or PBS at 37°C for 10 and 30 min. Control HEK293 cells were treated with GRP (10 and 100 nM) or PBS in a similar manner. A subset of transfected HEK293 cells remained untreated and served as a negative control. After incubation, the cells were harvested and lysed by protein immunoprecipitation lysis buffer (Thermo Fisher Scientific) with proteinase inhibitor and phosphatase inhibitor (Roche Diagnostics). Cell lysates were centrifuged at 4°C for 20 min. The supernatants were collected and protein concentrations were determined by BCA assay. Equal amounts of cell lysates were loaded onto NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris mini gels, electrophoresed, and transferred to PVDF using standard protocols. The blot was first probed with anti-GRPR (catalog #ab39883; Abcam), anti-Akt antibody (catalog #9272S; Cell Signaling Technology), anti-phospho-Akt (catalog #05-1003; Millipore), and HRP-conjugated anti-GAPDH (catalog #3683; Cell Signaling Technology) antibody to identify the control GAPDH band at 37 kDa, 24 h at 4°C. Then, the blots were incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody, followed by detection of the ECL substrate.

Scratching behavior. To assess acute and chronic itch, the behavioral tests were performed as described previously with minor modifications (Sun and Chen, 2007; Akiyama et al., 2010; Maciel et al., 2014). One day before the experimental sessions, either the lumbar region or nape of the neck was shaved. On the day of experiments, mice were placed individually into acrylic chambers for at least 30 min to adapt to the new environment. Thereafter, mice were removed and injected intrathecally with 5 μ l of gastrin-releasing peptide (GRP, 1 nmol/site). Immediately after the injection, mice were returned to the chambers and recorded for 60 min.

In a different set of experiments, separate groups of mice were injected intradermally with 50 μ l of compound 48/80 (10 μ g/site), CQ (200 μ g/site), trypsin (200 μ g/site), or H₂O₂ (0.3%) into the nape of the neck. The scratching behavior was recorded for 40 min after the injections.

For the dry skin model, chronic itch was induced by application of a gauze soaked with a mixture of acetone and diethylether (1:1) on the nape of the mouse neck for 15 s, immediately followed by the application of distilled water for 30 s (AEW treatment), twice daily for 5 d. A different group of animals received distilled water application only, for a 45 s period (DW group). On the fifth day, the scratching behavior was recorded for 30 min after the last application.

We also investigated whether the direct activation of Akt would be able to induce scratching behavior. Mice received an intrathecal injection of 5 μ l containing the Akt activator SC79 (20 μ g/site; Sigma-Aldrich). Immediately after the injection, mice were returned to the chambers and the scratching bouts were recorded for 40 min.

For all the experimental models, the scratching behavior was measured as the number of scratches with hindpaws close to the treated site or at the mouse dorsum. Scratching behind the ears, but not on the face, was also taken into account.

All of the intrathecal injections in this study were performed in conscious animals according to the method described previously (Quintão et al., 2008) with some modifications. A 30-gauge needle connected to a Hamilton microsyringe was introduced through the skin and a volume of 5 μ l was injected between the L5 and L6 vertebral spaces.

Pharmacological treatments for itch studies. Mice were treated with the pseudopeptide GRPR antagonist, RC-3095 (1 nmol/site), administered intrathecally 10 min before the injection of GRP or the last application of AEW on the fifth day to investigate a possible role of GRPR in chronic itch. We also tested the nonpeptide GRPR/neuromedin B receptor (NMBR) antagonist PD176252 given intraperitoneally (1 and 5 mg/kg) 30 min before the injection of GRP or 5 mg/kg intraperitoneally 30 min before the last application of AEW on the fifth day. Previous data indicated the relevance of PI3K γ in trypsin-evoked itch. Therefore, to assess whether PI3K γ could be involved in GRPR signaling, the selective PI3K γ

inhibitor AS605240 (0.01–10 mg/kg) was given by gavage 30 min before GRP (1 nmol/site) injection or 30 min before the last application of AEW protocol.

To further evaluate the site of action of AS605240 (1 and 3 μ g/site), the compound was intrathecally coinjected with GRP. PD176252 (8.5 nmol/site) and AS605240 (3 μ g/site) were also injected intrathecally 10 min before the last application of AEW.

The doses of the pharmacological modulators were selected based on the literature and on pilot experiments (Camps et al., 2005; Merali et al., 2006; Pereira et al., 2011; Su and Ko, 2011). PD176252 and AS605240 (both purchased from Tocris Bioscience) were prepared daily and dissolved in their vehicles, 1% Tween 20 in saline solution or 0.5% carboxymethylcellulose/0.25% Tween 20, respectively. RC-3095 (Adooq Bioscience) was prepared on the day of the experiments in DMSO 0.1% in saline solution. Control groups received the respective vehicles by the same route of administration. The final concentrations of solvents did not display any significant effect per se. PD176252 is a competitive antagonist with a high affinity for NMBR ($K_i = 0.17$ nM) and GRPR ($K_i = 1.0$ nM) receptors (Ashwood et al., 1998). However, it has been shown that PD176252 specifically inhibited GRP binding to GRPR ($IC_{50} = 30$ nM) on lung cancer cells and has the same effects that the selective pseudopeptide antagonist RC-3095 on myometrium contractility, where the GRP/GRPR system is involved (Moody et al., 2003; Tattersall et al., 2012). AS605240 is classified as a selective inhibitor of PI3K γ ($IC_{50} = 8$ nM), with 30-fold selectivity over PI3K δ and PI3K β and 7.5-fold selectivity over PI3K α , as indicated by the supplier (Camps et al., 2005).

Statistical analysis. Data are presented as the mean \pm SEM of 6–8 animals per group for behavior experiments. In the case of flow cytometry analysis, an experimental n of 4 per group was used. For Western blot analysis and Ca²⁺ imaging, an experimental n of 3 independent experiments was used. Statistical comparison of the results was performed by paired or unpaired Student's t test or by one-way ANOVA followed by Tukey's test or Student's t test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. GraphPad Prism software version 5.0 was used for statistical analysis.

Results

GRP activates capsaicin-sensitive DRG neurons

GRP has long been known to control circadian rhythm, satiety, memory modulation centrally and it has been shown recently to be involved in itch transmission. It is as yet unclear where and how GRP induces scratching behavior when injected intrathecally. Because pruritogens including 5-HT, CQ, and SLIGRL-NH2 were shown to induce calcium flux directly in DRG neurons (Liu et al., 2009; Akiyama et al., 2010), we hypothesized that some of GRP actions could be, at least in part, mediated by DRG afferent neurons. Here, we confirm previous findings showing that 5-HT (Fig. 1A), CQ (Fig. 1B), and SLIGRL (Fig. 1C) induced a transient and concentration-dependent calcium flux in cultured DRG neurons. Our data also highlight that GRP (0.001–1 μ M) induced calcium flux in DRG neurons, an effect relatively stronger (higher amplitude) and broader (higher number of cells activated) than the other agents (Fig. 1D). GRP-responsive cells were mostly small-diameter (soma of <300 μ m²; Fig. 1E), capsaicin-sensitive neurons (Fig. 1F). These data are consistent with the presence of functional GRPR on TRPV1⁺ DRG neurons. Next, we performed whole-cell patch-clamp on calcium imaging and identified GRP-responsive cells. When exposed to GRP (0.1 μ M), nociceptors (diameter <25 μ m) showed significant depolarization of the resting membrane potential (RMP) of ~ 20 mV, which led to action potential firing ($n = 5$, $p = 0.001$). Neurons prescreened with calcium imaging that were non-GRP responsive showed no difference in RMP (-73.0 ± 3.5 mV vs -72.0 ± 4.5 mV, $n = 3$; $p = 0.47$) when reexposed to GRP (data not shown). The specificity of GRP responses for GRPR was assessed and showed that GRP-induced Ca²⁺ flux was reversed by the cotreat-

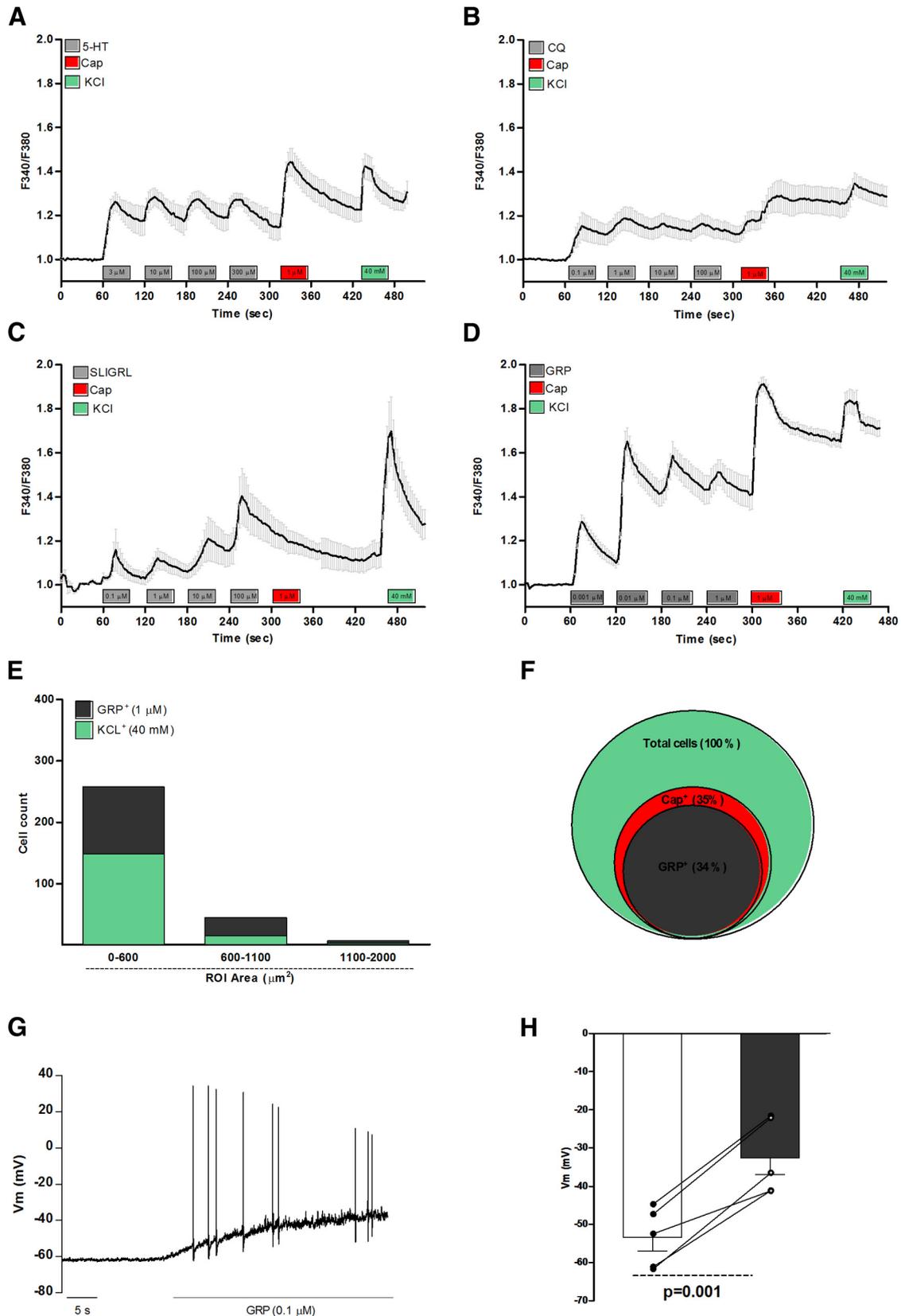


Figure 1. GRP activates capsaicin-sensitive DRG neurons from naive mice. Data show the average calcium flux in responsive neurons exposed to increasing concentration of (A) 5-HT (3–300 μ M), (B) CQ (0.1–100 μ M), (C) SLIGRL (0.1–100 μ M), and (D) GRP (0.1–100 μ M). E, Size of GRP responsive cells. F, Venn diagram showing overlapping populations of KCL⁺ GRP⁺ and capsaicin responsive neurons. G, H, Current-clamp recordings of GRP-responsive cells (<25 μ m) prescreened with calcium imaging and retreated with GRP (0.1 μ M) showed a transient depolarization of the RMP (53.5 \pm 3.5 mV vs 32.5 \pm 4.5 mV, n = 5) and action potential firing. Significant depolarization of the RMP before and after GRP treatment was calculated by paired Student's t test (p = 0.001). Respectively, a total of 524 (A), 369 (B), 375 (C), 533 (D), 302 (E), 533 (F), 5 (G), and 5 (H) cells were analyzed.

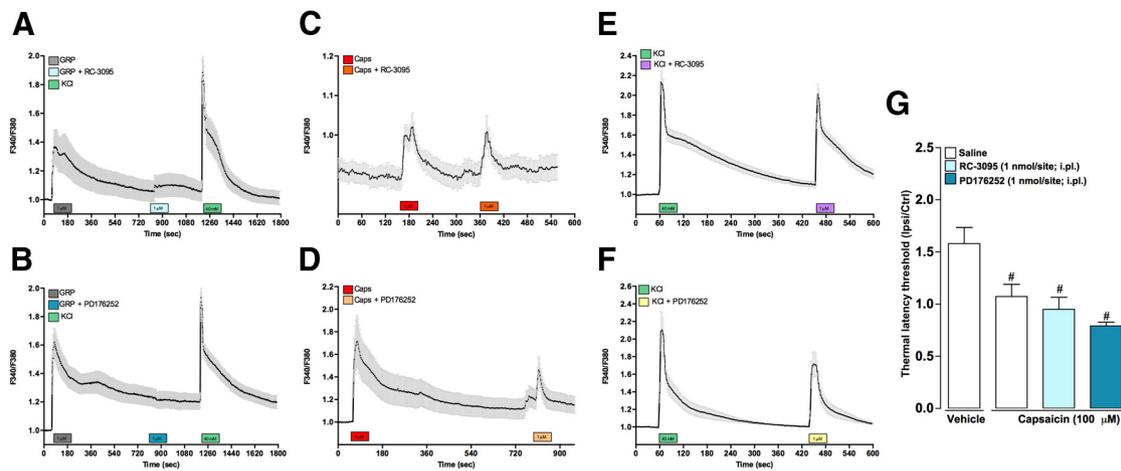


Figure 2. The GRPR antagonists did not affect capsaicin- or KCl-induced calcium response in DRG neurons nor capsaicin-induced thermal hyperalgesia. Effects of the cotreatment with the GRPR antagonists (**A, C, E**) RC-3095 (1 μ M) or (**B, D, F**) PD176252 (1 μ M) on Ca^{2+} flux induced by (**A, B**) GRP (1 μ M), (**C, D**) capsaicin (1 μ M), or (**E, F**) KCl (40 mM). **G**, Effects of the GRPR antagonists on capsaicin-induced thermal hyperalgesia. Data are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's test ($n = 8$ mice per group). Significant differences from saline injection are indicated by # $p < 0.05$. Respectively, a total of 132 (**A**), 196 (**B**), 59 (**C**), 14 (**D**), 24 (**E**), and 137 (**F**) cells were analyzed.

ment with the GRPR antagonists RC-3095 (1 μ M; Fig. 2*A*) and PD176252 (1 μ M; Fig. 2*B*), whereas the response to capsaicin and KCl was preserved (Fig. 2*C–F*). We also showed that the GRPR antagonists did not affect capsaicin-induced thermal hyperalgesia (Fig. 2*G*), suggesting selectivity only for GRP-mediated effects.

GRPR signals through the PI3K γ /Akt pathway

Sun and colleagues (Sun and Chen, 2007; Sun et al., 2009) reported that GRPR is expressed in naive mouse spinal cord. To gain further insight into the potential signaling pathways downstream of GRPR, we treated *ex vivo* mouse spinal cords with GRP (0.01–0.1 μ M) and assessed the activation of different MAP kinases by flow cytometry of dissociated spinal neurons. GRP (0.001 and 0.1 μ M, 5 and 30 min) did not affect p38 and ERK1/2 activation (Fig. 3*A, B*), but significantly increased Akt phosphorylation after a 5 min (0.003–0.1 μ M) or 30 min (0.1 μ M) (Fig. 3*C, D*) exposure. Pretreatment with the nonpeptide GRPR antagonist PD176252 (30 and 100 μ M; Fig. 3*E*) or the PI3K γ -selective inhibitor AS605240 (0.01 and 0.03 μ M; Fig. 3*F*) prevented, in a concentration-dependent manner, GRP-induced Akt phosphorylation. These data indicate that centrally expressed GRPR signals at least partly via the PI3K γ /Akt pathway. To refine evidence on the intracellular signaling cascade downstream of GRPR, we also performed Western blots from HEK293 cells transiently expressing GRPR and exposed to GRP (0, 10, or 100 nM) for 10 or 30 min. The expression levels of GRPR, p-Akt, and total Akt were quantified and ratioed over GAPDH (Fig. 4*A, B*). Compared with PBS, GRP significantly increased the p-Akt/Akt protein levels, an effect limited to the GRPR-transfected cells. These data are consistent with the hypothesis that GRPR stimulation leads to activation of the PI3K γ /Akt pathway.

GRP- and dry-skin-induced itch are reversed by GRPR and PI3K γ blockade

The intrathecal delivery of GRP induces scratching behavior in mice (Sun and Chen, 2007; Sun et al., 2009), an effect that we reproduced here (GRP, 1 nmol/site, i.t.; Fig. 5). Such scratching behavior was prevented by local treatment with RC-3095 (1 nmol/site, i.t.) and systemic treatment with PD176252 (1

and 5 mg/kg, i.p.) (Fig. 5*A*). PD176252 also reduced the scratching induced by other pruritogens, namely compound 48/80, CQ, trypsin, and H_2O_2 , while displaying different profiles of inhibition (Table 1).

Although there is literature focusing on the role of GRPR and its upstream mediators, in itch, a careful look into the downstream signaling pathways activated by this receptor is missing. Here, we assessed the effects of the selective PI3K γ inhibitor AS605240 on the scratching behavior induced by GRP. A significant decrease in the total number of scratches was observed when mice were treated orally with AS605240 (0.01–3 mg/kg; Fig. 5*B*). To further assess whether the PI3K γ inhibitor had any effect at the spinal level, AS605240 (1 and 3 μ g/site) was coinjected intrathecally with GRP (1 nmol/site) in conscious animals. Intrathecal treatment with AS605240 resulted in significantly diminished GRP-evoked scratching behavior compared with mice that received GRP and vehicle treatment (Fig. 5*C*).

Next, we used the dry skin model (AEW) to investigate the implication of GRPR in chronic itch. As depicted in Figure 5*D*, AEW triggered significant scratching behavior compared with distilled water (control) and the intrathecal administration of either GRPR antagonists RC-3095 (1 nmol/site) or PD176252 (8.5 nmol/site) significantly affected this behavior. In addition, systemic treatment with PD176252 (5 mg/kg, i.p.) significantly reduced the scratch bouts in AEW mice to values similar to those seen in water-treated controls. These data highlight the relevance of GRPR in this chronic model of itching. We next investigated whether PI3K γ might be relevant in the AEW model. AS605240 administered orally (0.3–10 mg/kg; Fig. 5*E*) significantly diminished dry-skin-induced itch. The spinal effects of AS605240 (3 μ g/site) were also evaluated in the dry skin model and significantly reduced the scratching behavior caused by AEW (Fig. 5*F*). These results demonstrate that GRPR is involved in dry skin itch, along with PI3K γ , the latter acting as a key downstream signaling molecule in the GRP/GRPR system. The selectivity of the PI3K γ inhibitor for itch sensation over nociception was also assessed and AS605240 did not affect formalin-induced orofacial pain (data not shown). Altogether, our findings indicate that the gamma

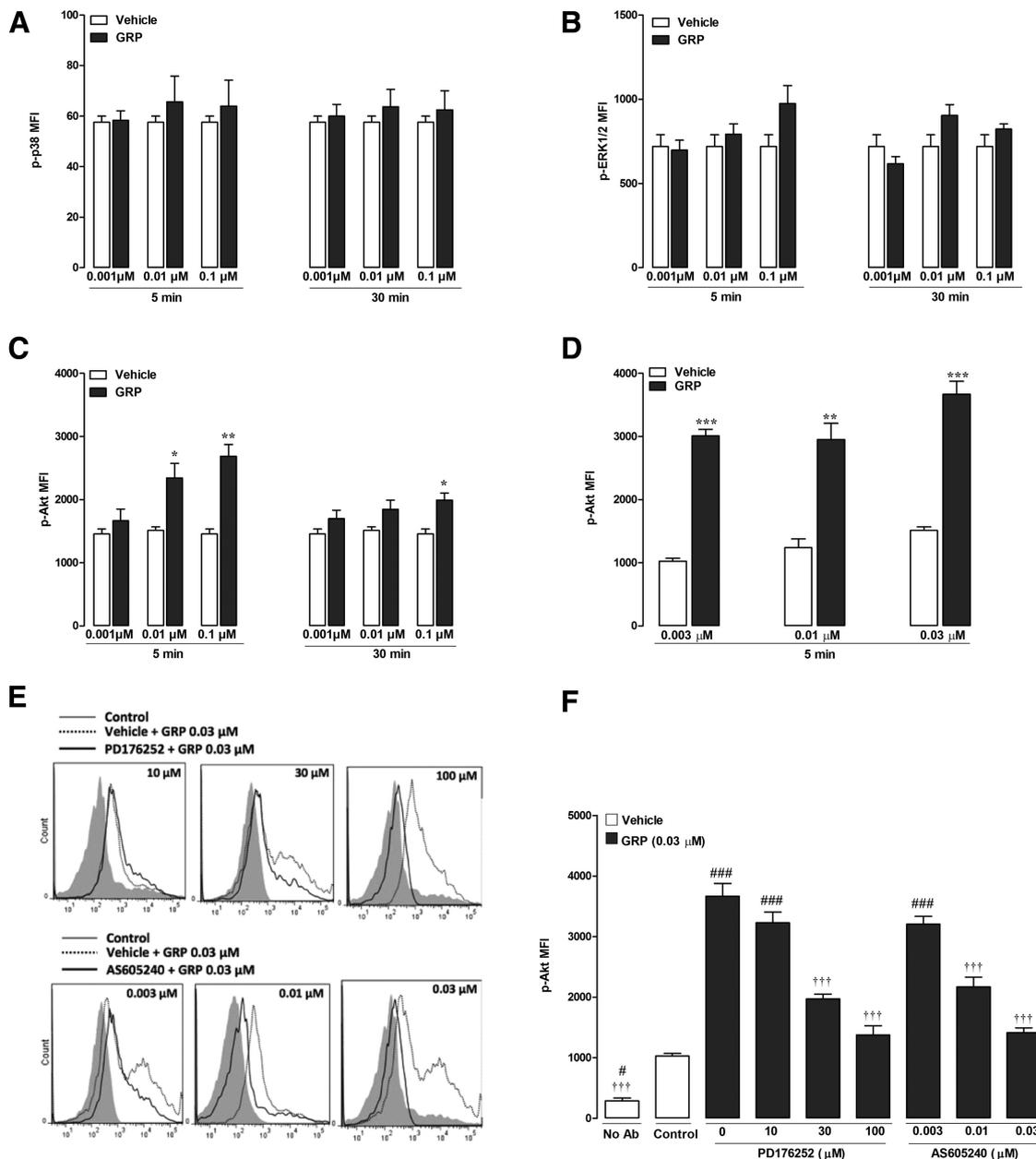


Figure 3. GRP triggers Akt phosphorylation in *ex vivo* mouse spinal cords. Assessment of (A) p38, (B) ERK1/2, and (C) Akt phosphorylation in *ex vivo* mouse spinal cords exposed to GRP (0.001–0.1 μ M). D, Treatment with different concentrations (0.003–0.03 μ M) of GRP on Akt phosphorylation. E, Representative flow cytometry histograms for Akt phosphorylation in spinal cords treated with saline (control; gray), GRP (0.03 μ M; dashed line), or GRP (0.03 μ M) after incubation with the GRPR antagonist PD176252 (10, 30, and 100 μ M; top, solid back line) or the selective PI3K γ inhibitor AS605240 (0.003, 0.01, and 0.03 μ M; bottom, solid back line). F, Quantification of mean fluorescence intensity (MFI) for p-Akt after treatment with saline or GRP (0.03 μ M) in the presence of the GRPR antagonist PD176252 (10, 30, and 100 μ M) or the selective PI3K γ inhibitor AS605240 (0.003, 0.01, and 0.03 μ M). Data represent mean \pm SEM. Unpaired Student's *t* test or one-way ANOVA followed by Tukey's test (*n* = 4 mice per group). Significant differences in comparison with vehicle incubation, control, or GRP are indicated by **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, ###*p* < 0.001, and †††*p* < 0.001, respectively.

isoform of PI3K is important in the spinal transmission of GRP/GRPR-mediated itch.

Spinal Akt activation induces scratching behavior in mice

Given that the PI3K γ signals through Akt, we assessed the impact of direct spinal Akt activation on mouse scratching behavior. The intrathecal injection of the Akt activator SC79 (20 μ g/site) induced significant itching compared with vehicle-injected animals (Fig. 6). These data reveal that the spinal activation of Akt can trigger itch directly.

Discussion

The study of itch has blossomed and significant progress has been made in the past 10 years. Sun and colleagues (Sun and

Chen, 2007; Sun et al., 2009) reported that GRPR mediates itch sensation, but not pain, in the spinal cord, suggesting that this receptor is part of an itch-specific pathway. Since then, GRP and GRPR have been the subjects of several studies, some of which challenge the results of others, but always indicate their relevance in pruritus (Sun and Chen, 2007; Mishra and Hoon, 2013; Liu et al., 2014; Solorzano et al., 2015). The present study brings additional insights to this field.

Pruritogens, including 5-HT, CQ, and SLIGRL-NH₂, evoke Ca²⁺ response in DRGs (Liu et al., 2009; Akiyama et al., 2010) and our data confirmed these findings. We also investigated the functionality of GRPR in DRG sensory neurons by stimulating

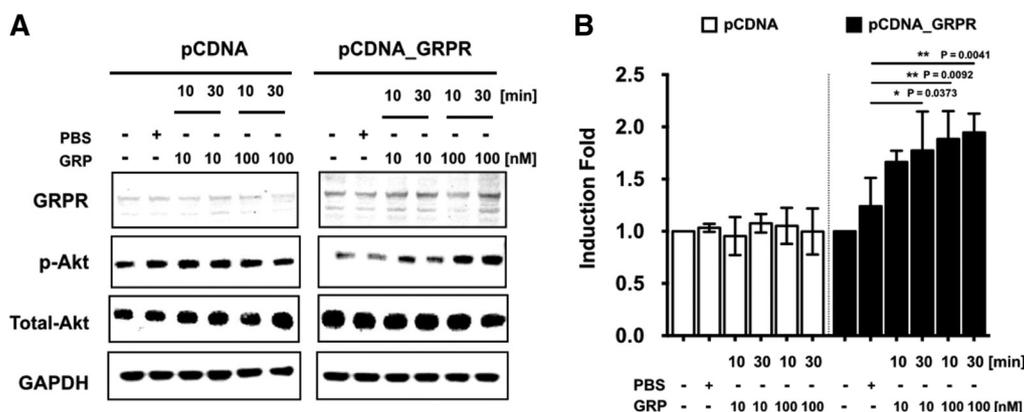


Figure 4. GRP activates the PI3Kγ/Akt pathway in HEK293 cells transfected with GRPR. **A**, Representative Western blots of GRPR, p-Akt, total Akt, and GAPDH in HEK293 transiently expressing GRPR and treated with GRP (0, 10 or 100 nM) for 10 or 30 min. **B**, Bar graph shows quantification of p-Akt/total Akt expression. Data are expressed as mean ± SEM of three independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's test. Significant differences from PBS are indicated by **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

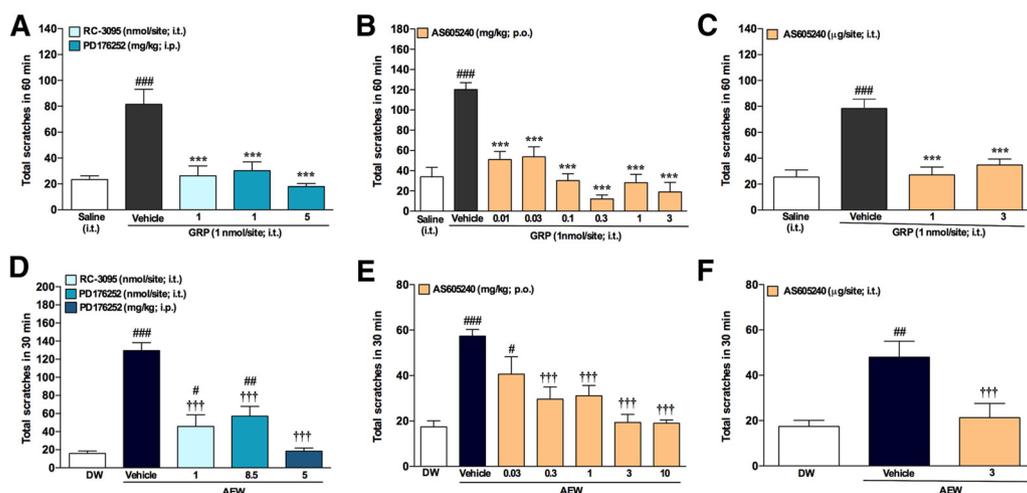


Figure 5. GRPR blockade or PI3Kγ inhibition reversed GRP- and dry-skin-induced itch. **A**, Effects of the GRPR antagonists RC-3095 (1 nmol/site, i.t.) and PD176252 (1 and 5 mg/kg) on GRP-induced itch. **B**, Effects of the oral treatment with the selective PI3Kγ inhibitor AS605240 (0.01–3 mg/kg) on scratching behavior evoked by GRP. **C**, Intrathecal coinjection of GRP (1 nmol/site) and AS605240 (1 and 3 μg/site). Dry skin itch (AEW) is alleviated after treatment with **(D)** RC-3095 (1 nmol/site, i.t.) or PD176252 (8.5 nmol/site, i.t. or 5 mg/kg, i.p.) before the last application of AEW, **(E)** AS605240 (0.03–10 mg/kg; p.o.), 30 min before the last application of AEW, or **(F)** AS605240 (3 μg/site, i.t.) injected 10 min before the last application of AEW. Data are expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's test (*n* = 8 mice per group). Significant different from saline injection or distilled water treatment, GRP injection, or AEW treatment are indicated by ##*p* < 0.01; ###, ****p* < 0.001; and †††*p* < 0.001.

Table 1. Effects of treatment with the selective and non-peptide GRPR antagonist PD176252 on the scratching behavior elicited by different pruritogens in mice

Purigen	No. of scratching bouts		
	Vehicle	PD176252 (1 mg/kg)	PD176252 (5 mg/kg)
Compound 48/80 (10 μg/site)	67 ± 5	23 ± 10**	29 ± 4**
Chloroquine (200 μg/site)	75 ± 8	29 ± 4*	13 ± 3**
Trypsin (200 μg/site)	68 ± 3	54 ± 6 ^{NS}	16 ± 2**
H ₂ O ₂ (0.3%/site)	44 ± 7	14 ± 4**	06 ± 2**

Shown are the total number of scratches after intradermal injection of different pruritogens. Data represent mean ± SEM.

p* < 0.05, *p* < 0.01, one-way ANOVA followed by Tukey's test (*n* = 6–8 mice per group), statistically significant when comparing PD176252-treated groups with control vehicle-treated animals. NS, Nonsignificant when comparing PD176252-treated groups with control vehicle-treated animals.

isolated culture DRG neurons with GRP. The present data show that GRP can excite small-size, capsaicin-sensitive DRG neurons and two types of GRPR antagonists blocked these responses. Conversely, GRPR antagonism did not affect capsaicin and KCl-induced Ca²⁺ flux or capsaicin-induced thermal hyperalgesia.

Intrathecal GRP acts via GRPR to induce scratching behavior; however, the mechanisms downstream of GRPR activation remain unclear (Sun and Chen, 2007; Liu et al., 2011; Mishra and Hoon, 2013; Kardon et al., 2014). Czepielewski et al. (2012) demonstrated that GRP induces neutrophil chemotaxis through GRPR via p38, ERK 1/2, and PI3K activation. Here, we did not observe p38 or ERK 1/2 activation when spinal cords were treated with GRP, but did show that GRP induces Akt phosphorylation, a marker of PI3K activation. Using the potent selective PI3Kγ-isoform inhibitor AS605240 instead of a pan-inhibitor of PI3K, we demonstrated that PI3Kγ is activated downstream of GRP/GRPR. We confirmed that p-Akt is significantly increased after GRP incubation by performing Western blots on HEK293 cells transiently expressing GRPR. Again, these findings indicate that PI3Kγ is a major downstream effector of the GRP/GRPR system.

Recent studies demonstrated that the pseudopeptide GRPR antagonist RC-3095 reduces GRP-evoked itch (Inan et al., 2011; Sukhtankar and Ko, 2013; Akiyama et al., 2014). Here, we show that RC-3095 and the nonpeptide antagonist PD176252 mark-

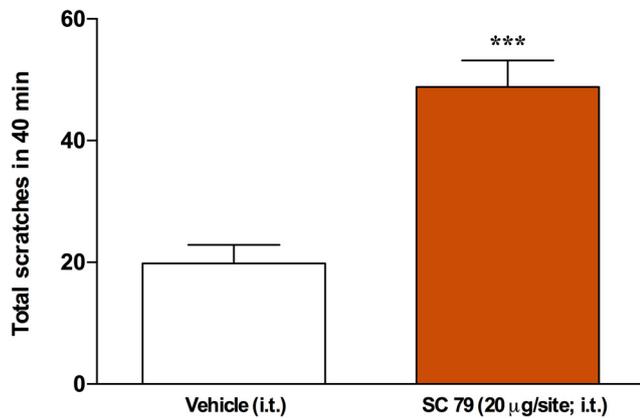


Figure 6. Spinal Akt activation triggers scratching behavior in mice. Scratching behavior induced by intrathecal injection of the Akt activator SC79 (20 μ g/site). Data represent mean \pm SEM. Student's *t* test ($n = 6$ mice per group). *** $p < 0.001$.

edly reversed GRP-induced itch. As demonstrated before (Sun and Chen, 2007), GRPR deletion or antagonism prevents the scratching behavior elicited by the intradermal application of compound 48/80 and CQ, an effect that we replicated herein with PD176252 and extended to H₂O₂ and trypsin, reinforcing the central role of GRPR in itch transmission.

Considering the lack of data on the signaling pathways downstream of the GRP/GRPR system in the context of central itch transmission, we tested the effects of the potent and selective PI3K γ inhibitor AS605240 on GRP-induced itch. Oral treatment with AS605240 significantly reduced the GRP-induced scratching behavior. Accordingly, a previous study from our group showed that AS605240 relieves trypsin-mediated scratching behavior in mice (Pereira et al., 2011). We further assessed whether AS605240 displays local spinal effect when coinjected with GRP and observed that the itching response was significantly diminished. This clearly suggests that PI3K γ plays a key role in acute itch spinal transmission involving GRP/GRPR. PI3K γ acts via Akt phosphorylation and, to support PI3K γ as an important itch transducer, we showed that the direct activation of spinal Akt after the intrathecal administration of SC79 induced scratching behavior in mice.

The GRPR/PI3K γ pathway could also be involved in chronic itching, a more clinically relevant condition. We addressed this using the dry skin model (AEW) of itch and tested the local effects of RC-3095 and the systemic and local effects of PD176252 and AS605240. GRPR blockade, as well as PI3K γ inhibition, significantly reduced the scratching behavior induced by skin dryness. Mice treated with RC-3095, PD176252, and AS605240 behaved normally and did not exhibit apparent adverse effects, sedation or impaired motor functions.

PD176252 is a competitive antagonist of the two bombesin receptor subtypes. We confirmed our findings with PD176252 using a second and selective GRPR antagonist (RC-3095) and are therefore confident that the responses that we observed can be ascribed to GRPR. In the case of AS605240, it has been classified as a potent inhibitor of PI3K γ (IC₅₀ = 8 nM), with a 30-fold selectivity over PI3K δ and PI3K β and a 7.5-fold selectivity over PI3K α (Camps et al., 2005). The initial study that presented the AS605240 compound showed that treatment with AS605240 or PI3K γ knock-out mice equally reversed inflammation in two models of collagen-induced arthritis (Camps et al., 2005). The authors also tested the specificity of AS605240 against a panel of 50 kinases and only found inhibitory activity against PI3K γ .

Given this body of literature, we are confident that our data with AS605240 can be ascribed to PI3K γ .

Our findings that AS605240 reduces acute and chronic itch are consistent with several other studies showing that PI3K γ inhibition or PI3K γ knock-out decreases inflammation in a series of rodent models of inflammation (Barber et al., 2005; Camps et al., 2005; Fougerat et al., 2008; Passos et al., 2010; Peng et al., 2010; Roller et al., 2012). However, our findings contrast with a study published by Lee et al. (2011) showing that scratching behavior induced by intradermal injection of histamine or SLIGRL-NH₂, but not CQ, is increased in PI3K γ knock-out mice, an effect not reproduced pharmacologically. Explanations for these discrepant results are numerous and include differences in pruritogens (histamine vs GRP) and routes of administration (intradermal vs intrathecal) tested. It is also plausible that PI3K γ knock-out mice develop compensatory mechanisms. For example, both PLC and PI3K γ signal using PIP₂, which, in the absence of the PI3K γ input, might lead to higher PIP₂ availability and consequent increase in PLC-dependent pathways. Therefore, the histamine/H1R complex, which typically leads to TRPV1 sensitization via PLC, might be increased in PI3K γ knock-out mice. Given that TRPV1 knock-out animals have reduced histaminergic itch (Shim et al., 2007), compensatory pathways might explain the unexpected findings of Lee et al. (2011).

A previous study demonstrated that PI3K δ and PI3K γ inhibition ameliorated imiquimod (IMQ)-induced psoriasis-like dermatitis, correlating with a diminution of skin IL-17⁺ γ δ T cells. Interfering with the PI3K δ and PI3K γ pathways also inhibited the production of IL-17 and IFN- γ by T cells from healthy donors and psoriatic patients, indicating that PI3K γ , together with the δ -isoform, is required for IMQ-induced dermatitis and is a potential target for psoriasis treatment (Roller et al., 2012). Unlike several studies looking into the immunological roles of PI3K γ (Barber et al., 2005; Camps et al., 2005; Peng et al., 2010; Rodrigues et al., 2010; Roller et al., 2012), we observed that PI3K γ activation in the spinal cord plays an important role during chronic itch.

Sun and Chen (2007) highlighted that GRPR transcript expression is restricted to the laminae I of the mouse spinal cord dorsal horn. Here, we showed that GRP can activate directly (calcium flux) small-size, capsaicin-sensitive DRG neurons via GRPR, an effect that often translates into action potential firing. Our electrophysiological data suggest that GRP injected intrathecally and the consequent scratching behavior might be mediated by central terminals of DRG nociceptive afferent neurons. Such a hypothesis could provide an explanation for the pruritogenic effects of GRP when delivered spinally (Sun and Chen, 2007) and for the recent report of Solorzano et al. (2015) suggesting that spinal interneurons are one of the main sources of GRP in the spinal cord. It is conceivable that interneuron-released GRP could act presynaptically on these DRG afferents. This hypothesis also aligns with a recent report showing that PI3K γ is selectively expressed by nociceptive DRG neurons (Leinders et al., 2014). The PI3K γ inhibitor that we used here is highly lipophilic and expected to cross the blood–brain barrier (Camps et al., 2005) and has been demonstrated to delay experimental cerebral malaria when given orally (Lacerda-Queiroz et al., 2015). To support a neuronal activity for PI3K γ , we administered AS605240 systemically and intrathecally and found an equally potent reduction of dry-skin-induced scratching behavior.

Our findings strongly suggest that GRPR is expressed by central terminals of DRG nociceptive afferents, which transmit itch via the PI3K γ /Akt pathway. The exact role of PI3K γ in these

fibers has yet to be unraveled, but appears to be instrumental for GRPR itch transmission. It is tempting to propose PI3K γ as an attractive target with which to control GRPR-mediated pruritus.

References

- Akiyama T, Carstens MI, Carstens E (2010) Enhanced scratching evoked by PAR-2 agonist and 5-HT but not histamine in a mouse model of chronic dry skin itch. *Pain* 151:378–383. [CrossRef Medline](#)
- Akiyama T, Tominaga M, Takamori K, Carstens MI, Carstens E (2014) Roles of glutamate, substance P, and gastrin-releasing peptide as spinal neurotransmitters of histaminergic and nonhistaminergic itch. *Pain* 155:80–92. [CrossRef Medline](#)
- Ashwood V, Brownhill V, Higginbottom M, Horwell DC, Hughes J, Lewthwaite RA, McKnight AT, Pinnock RD, Pritchard MC, Suman-Chauhan N, Webb C, Williams SC (1998) PD 176252—the first high affinity non-peptide gastrin-releasing peptide (BB2) receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 8:2589–2594. [CrossRef Medline](#)
- Barber DF, Bartolomé A, Hernandez C, Flores JM, Redondo C, Fernandez-Arias C, Camps M, Rückle T, Schwarz MK, Rodríguez S, Martínez AC, Balomenos D, Rommel C, Carrera AC (2005) PI3K γ inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med* 11:933–935. [Medline](#)
- Camps M, Rückle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, Ferrandi C, Chabert C, Gillieron C, Françon B, Martin T, Gretener D, Perrin D, Leroy D, Vitte PA, Hirsch E, Wymann MP, Cirillo R, Schwarz MK, Rommel C (2005) Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 11:936–943. [Medline](#)
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306–313. [CrossRef Medline](#)
- Czepielewski RS, Porto BN, Rizzo LB, Roesler R, Abujamra AL, Pinto LG, Schwartsmann G, Cunha Fde Q, Bonorino C (2012) Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:547–552. [CrossRef Medline](#)
- Davidson S, Giesler GJ (2010) The multiple pathways for itch and their interactions with pain. *Trends Neurosci* 33:550–558. [CrossRef Medline](#)
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7:606–619. [Medline](#)
- Fougerat A, Gayral S, Gourdy P, Schambourg A, Rückle T, Schwarz MK, Rommel C, Hirsch E, Arnal JF, Salles JP, Perret B, Breton-Douillon M, Wymann MP, Laffargue M (2008) Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase- γ reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes. *Circulation* 117:1310–1317. [CrossRef Medline](#)
- Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T, Jensen RT (2008) Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15:58–64. [CrossRef Medline](#)
- Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S, Yosipovitch G, Schmelz M (2006) The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci* 7:535–547. [CrossRef Medline](#)
- Inan S, Dun NJ, Cowan A (2011) Investigation of gastrin-releasing peptide as a mediator for 5'-guanidinonaltrindole-induced compulsive scratching in mice. *Peptides* 32:286–292. [CrossRef Medline](#)
- Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV (2008) International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 60:1–42. [CrossRef Medline](#)
- Kardon AP, Polgár E, Hachisuka J, Snyder LM, Cameron D, Savage S, Cai X, Karnup S, Fan CR, Hemenway GM, Bernard CS, Schwartz ES, Nagase H, Schwarzer C, Watanabe M, Furuta T, Kaneko T, Koerber HR, Todd AJ, Ross SE (2014) Dynorphin acts as a neuromodulator to inhibit itch in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuron* 82:573–586. [CrossRef Medline](#)
- Kini SP, DeLong LK, Veledar E, McKenzie-Brown AM, Schaufele M, Chen SC (2011) The impact of pruritus on quality of life: the skin equivalent of pain. *Arch Dermatol* 147:1153–1156. [CrossRef Medline](#)
- Lacerda-Queiroz N, Brant F, Rodrigues DH, Vago JP, Rachid MA, Sousa LP, Teixeira MM, Teixeira AL (2015) Phosphatidylinositol 3-Kinase γ is required for the development of experimental cerebral malaria. *PLoS One* 10:e0119633. [CrossRef Medline](#)
- LaMotte RH, Dong X, Ringkamp M (2014) Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nat Rev Neurosci* 15:19–31. [Medline](#)
- Lee B, Descalzi G, Baek J, Kim JI, Lee HR, Lee K, Kaang BK, Zhuo M (2011) Genetic enhancement of behavioral itch responses in mice lacking phosphoinositide 3-kinase- γ (PI3K γ). *Mol Pain* 7:96. [CrossRef Medline](#)
- Leinders M, Koehn FJ, Bartok B, Boyle DL, Shubayev V, Kalcheva I, Yu NK, Park J, Kaang BK, Hefferan MP, Firestein GS, Sorokin LS (2014) Differential distribution of PI3K isoforms in spinal cord and dorsal root ganglia: potential roles in acute inflammatory pain. *Pain* 155:1150–1160. [CrossRef Medline](#)
- Liu C, Liu TT, He ZG, Shu B, Xiang HB (2014) Inhibition of itch-related responses by selectively ablated serotonergic signals at the rostral ventromedial medulla in mice. *Int J Clin Exp Pathol* 7:8917–8921. [Medline](#)
- 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 (2009) Sensory neuron-specific GPCR Mrgpr8 is itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell* 139:1353–1365. [CrossRef Medline](#)
- Liu XY, Liu ZC, Sun YG, Ross M, Kim S, Tsai FF, Li QF, Jeffrey J, Kim JY, Loh HH, Chen ZF (2011) Unidirectional cross-activation of GRPR by MOR1D uncouples itch and analgesia induced by opioids. *Cell* 147:447–458. [CrossRef Medline](#)
- Maciel IS, Azevedo VM, Pereira TC, Bogo MR, Souza AH, Gomez MV, Campos MM (2014) The spinal inhibition of N-type voltage-gated calcium channels selectively prevents scratching behavior in mice. *Neuroscience* 277:794–805. [CrossRef Medline](#)
- Majumdar ID, Weber HC (2011) Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18:68–74. [CrossRef Medline](#)
- Merali Z, Bédard T, Andrews N, Davis B, McKnight AT, Gonzalez MI, Pritchard M, Kent P, Anisman H (2006) Bombesin receptors as a novel anti-anxiety therapeutic target: BB1 receptor actions on anxiety through alterations of serotonin activity. *J Neurosci* 26:10387–10396. [CrossRef Medline](#)
- Mishra SK, Hoon MA (2013) The cells and circuitry for itch responses in mice. *Science* 340:968–971. [CrossRef Medline](#)
- Moody TW, Leyton J, Garcia-Marin L, Jensen RT (2003) Nonpeptide gastrin releasing peptide receptor antagonists inhibit the proliferation of lung cancer cells. *Eur J Pharmacol* 474:21–29. [CrossRef Medline](#)
- Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RD, Silva KA, Siqueira JM, Duarte FS, Leal PC, Medeiros R, Calixto JB (2010) Involvement of phosphoinositide 3-kinase γ in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1–40 peptide in mice. *Brain Behav Immun* 24:493–501. [CrossRef Medline](#)
- Peng XD, Wu XH, Chen LJ, Wang ZL, Hu XH, Song LF, He CM, Luo YF, Chen ZZ, Jin K, Lin HG, Li XL, Wang YS, Wei YQ (2010) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase γ ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 332:46–56. [CrossRef Medline](#)
- Pereira PJ, Lazarotto LF, Leal PC, Lopes TG, Morrone FB, Campos MM (2011) Inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase γ reduces pruriceptive, inflammatory, and nociceptive responses induced by trypsin in mice. *Pain* 152:2861–2869. [CrossRef Medline](#)
- Quintão NL, Passos GF, Medeiros R, Paszcuk AF, Motta FL, Pesquero JB, Campos MM, Calixto JB (2008) Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* 28:2856–2863. [CrossRef Medline](#)
- Rodrigues DH, Vilela MC, Barcelos LS, Pinho V, Teixeira MM, Teixeira AL (2010) Absence of PI3K γ leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 222:90–94. [CrossRef Medline](#)
- Roller A, Perino A, Dapavo P, Soro E, Okkenhaug K, Hirsch E, Ji H (2012) Blockade of phosphatidylinositol 3-kinase PI3K δ or PI3K γ reduces IL-17 and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis. *J Immunol* 189:4612–4620. [CrossRef Medline](#)
- Ross SE (2011) Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 21:880–887. [CrossRef Medline](#)
- Shim WS, Tak MH, Lee MH, Kim M, Kim M, Koo JY, Lee CH, Kim M, Oh U (2007) TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *J Neurosci* 27:2331–2337. [CrossRef Medline](#)

- Solorzano C, Villafuerte D, Meda K, Cevikbas F, Bráz J, Sharif-Naeini R, Juarez-Salinas D, Llewellyn-Smith IJ, Guan Z, Basbaum AI (2015) Primary afferent and spinal cord expression of gastrin-releasing peptide: message, protein, and antibody concerns. *J Neurosci* 35:648–657. [CrossRef Medline](#)
- Su PY, Ko MC (2011) The role of central gastrin-releasing peptide and neuromedin B receptors in the modulation of scratching behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 337:822–829. [CrossRef Medline](#)
- Sukhtankar DD, Ko MC (2013) Physiological function of gastrin-releasing peptide and neuromedin B receptors in regulating itch scratching behavior in the spinal cord of mice. *PLoS One* 8:e67422. [CrossRef Medline](#)
- Sun YG, Chen ZF (2007) A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature* 448:700–703. [CrossRef Medline](#)
- Sun YG, Zhao ZQ, Meng XL, Yin J, Liu XY, Chen ZF (2009) Cellular basis of itch sensation. *Science* 325:1531–1534. [CrossRef Medline](#)
- Tattersall M, Cordeaux Y, Charnock-Jones DS, Smith GC (2012) Expression of gastrin-releasing peptide is increased by prolonged stretch of human myometrium, and antagonists of its receptor inhibit contractility. *J Physiol* 590:2081–2093. [CrossRef Medline](#)
- Weisshaar E, Dalgard F (2009) Epidemiology of itch: adding to the burden of skin morbidity. *Acta Derm Venereol* 89:339–350. [CrossRef Medline](#)
- Wymann MP, Björklöf K, Calvez R, Finan P, Thomast M, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Laffargue M (2003) Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. *Biochem Soc Trans* 31:275–280. [CrossRef Medline](#)
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110. [CrossRef Medline](#)

Capítulo III

- 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS
 - 5. PERSPECTIVAS
 - 6. REFERÊNCIAS
-

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do prurido ganhou forças nos últimos 20 anos, mas foi durante a última década que grandes avanços foram alcançados. Duas das mais importantes descobertas são: (i) o GRPR como mediador de prurido na medula espinhal e, (ii) os neurônios que expressam GRPR como uma subpopulação de fibras na lâmina I necessárias para a transmissão da sensação de prurido, sem afetar a nocicepção (Sun e Chen, 2007, Sun et al., 2009). Esses achados são sugestivos da existência de uma via dedicada para a transmissão de prurido, dando suporte à teoria da especificidade. Desde então, o sistema GRP/GRPR tem sido avaliado em diversos trabalhos sobre a transmissão pruriceptiva, sobretudo não histaminérgica, com especial interesse nos mecanismos *upstream* a sua ativação. Existem estudos que mostram resultados conflitantes, principalmente em relação à localização do GRP e GRPR no circuito de transmissão, o que tem levado a certos atritos nesta área de pesquisa. Alguns autores sugerem que o GRP esteja presente em uma população de neurônios do corno dorsal, ao invés do DRG; outros, que o GRP esteja expresso em interneurônios no corno dorsal. Existem trabalhos que demonstram o GRPR presente em um subgrupo de neurônios na lâmina I do corno dorsal; já, outros autores afirmam que estas células sejam parte de uma população de interneurônios, enquanto que alguns autores sugerem que as fibras que expressam GRPR sejam neurônios terciários chamados de “pruriceptores terciários”. No entanto, todos os trabalhos concordam que o sistema GRP/GRPR é importante para a propagação da mensagem pruriceptiva (Sun e Chen, 2007, Sun et al., 2009, Mishra e Hoon, 2013, Zhao et al., 2013, Liu et al., 2014, Zhao et al., 2014a, Zhao et al., 2014b, Solorzano et al., 2015).

O GRPR tem sido apontado como um alvo relevante e eficaz para o desenvolvimento de fármacos antipruriginosos. Porém, o GRPR é responsável por importantes respostas fisiológicas como liberação de hormônios gastrintestinais, contração de musculatura lisa, controle da saciedade, regulação do ritmo circadiano e termo-regulação (Weber, 2009). Desta forma, o seu bloqueio farmacológico poderia causar efeitos adversos significativos. Assim, utilizar outras moléculas relacionadas ao sistema GRP/GRPR como alvo para o tratamento do prurido seria uma alternativa bastante promissora.

O que chama a atenção na área de pesquisa sobre o prurido é a falta de estudos com foco nas vias de sinalização intracelular ativadas pelos mediadores e receptores identificados, principalmente o GRP e o GRPR. Talvez isso ocorra por se acreditar que os receptores sempre irão ativar as vias clássicas já conhecidas.

Mas, e se o prurido for resultado da ativação de vias de sinalização alternativas? Assim, como o GRPR parece ser uma molécula “prurido-específica”, poderia ser hipotetizada a existência de vias de sinalização intracelulares que também façam parte desse circuito específico e, transmitam, com preferência, a sensação de prurido. A PI3K γ é expressa principalmente em células do sistema imune e endotélio e, está intimamente relacionada com a resposta inflamatória (Hawkins e Stephens, 2007). Ao contrário de outras vias mais estudadas, em condições normais, a via PI3K γ /Akt não está continuamente ativada. Possivelmente, durante respostas pruriceptivas, por algum mecanismo desconhecido, deve ocorrer uma mudança no perfil de ativação de vias de sinalização; havendo preferência por outras que nem sempre são acionadas, como por exemplo, a via PI3K γ /Akt. Sun e colaboradores foram os primeiros a mostrar que o GRPR não tem nenhum efeito sobre a nocicepção (Sun e

Chen, 2007, Sun et al., 2009) e diversos outros trabalhos confirmam esses resultados, inclusive os dados do presente estudo (Pereira et al., 2015). Seguindo o mesmo perfil de resposta, o bloqueio farmacológico da PI3K γ por via oral não teve efeito sobre a nocicepção induzida por capsaicina (Pereira et al., 2011), nem sobre a dor orofacial induzida por formalina (Figura suplementar 1), mas foi capaz de reduzir o prurido induzido por tripsina, composto 48/80 e GRP (Pereira et al., 2011, Pereira et al., 2015). Estes dados sugere, que a ativação de PI3K γ apresenta certa especificidade para a transmissão de prurido.

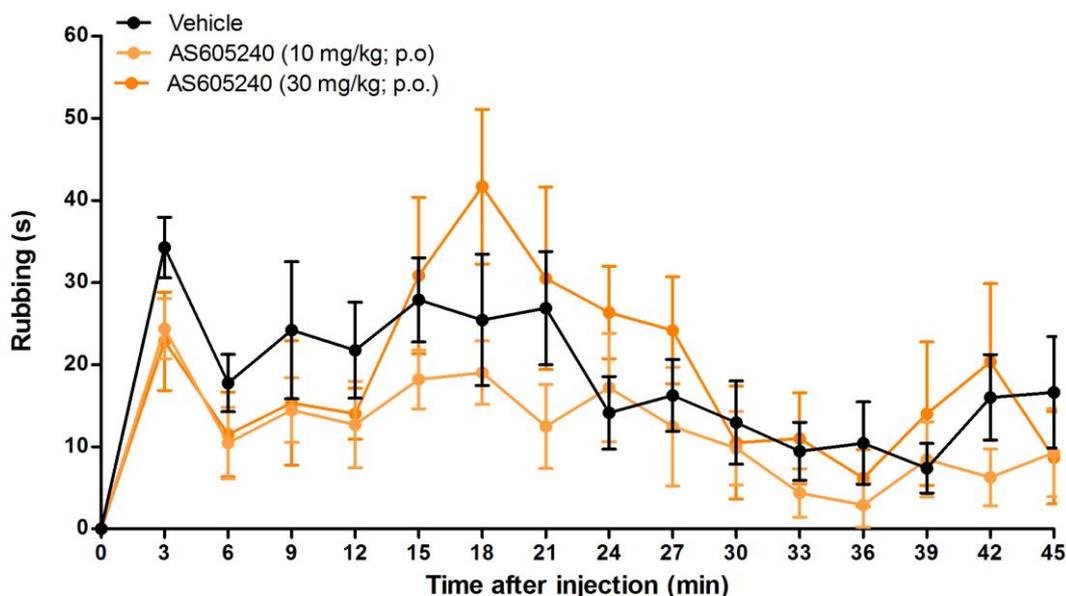


Figura suplementar 1. Efeito do inibidor seletivo de PI3K γ , AS605240, sobre a dor orofacial induzida por formalina (injeção s.c. de 20 μ L de formalina 4% no lábio superior direito). Cada ponto da curva representa a média de 8 animais e as linhas verticais o erro padrão da média.

Sabe-se que o GRPR é uma molécula-chave para a transmissão pruriceptiva e tem sido implicado no prurido crônico, não apenas em roedores, mas também em macacos (Sun et al., 2009, Nattkemper et al., 2013). Com o objetivo de investigar se a expressão de GRPR na medula espinhal estaria aumentada durante o prurido crônico,

foi utilizado o RT-qPCR para analisar a expressão do RNAm após a administração intratecal de GRP (prurido agudo) ou, após a indução de pele seca (AEW, prurido crônico). Como esperado, não houve diferença na expressão do RNAm para GRPR após a injeção solução salina ou de GRP (Figura suplementar 2A). No entanto, quando o prurido crônico foi induzido houve um aumento da expressão, embora não significativo $p = 0.09$, comparado com os animais controle (DW) (Figura suplementar 2B).

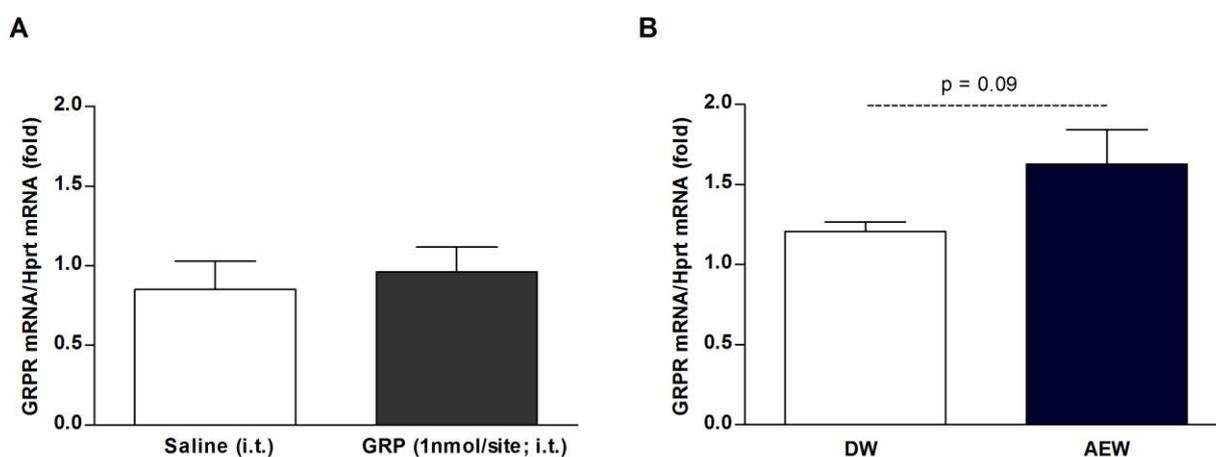


Figura suplementar 2. Expressão do RNAm para GRPR na medula espinhal de (A) animais que receberam injeção intratecal de 5 μ L contendo solução salina ou GRP (1 nmol/sítio) e, (B) animais controle (DW = água destilada) ou com pele seca (AEW). Cada coluna representa a média de 6-7 animais e as barras verticais representam o erro padrão da média.

Foi empregada a imunofluorescência para avaliar se o prurido crônico (pele seca; AEW) tem algum impacto sobre a fosforilação de Akt, produto da atividade da PI3K γ , na medula espinhal. A expressão de p-Akt aumentou significativamente após a indução de pele seca e, esse efeito foi reduzido de forma significativa após o

tratamento com o antagonista de GRPR, PD176252 (5 mg/kg; i.p.). Além disso, nossos resultados mostram que o GRPR está co-expresso com p-Akt na lâmina I e V do corno dorsal da medula espinhal, mas não com o marcador específico para lâmina II, PKC γ (Figura suplementar 3A-3C).

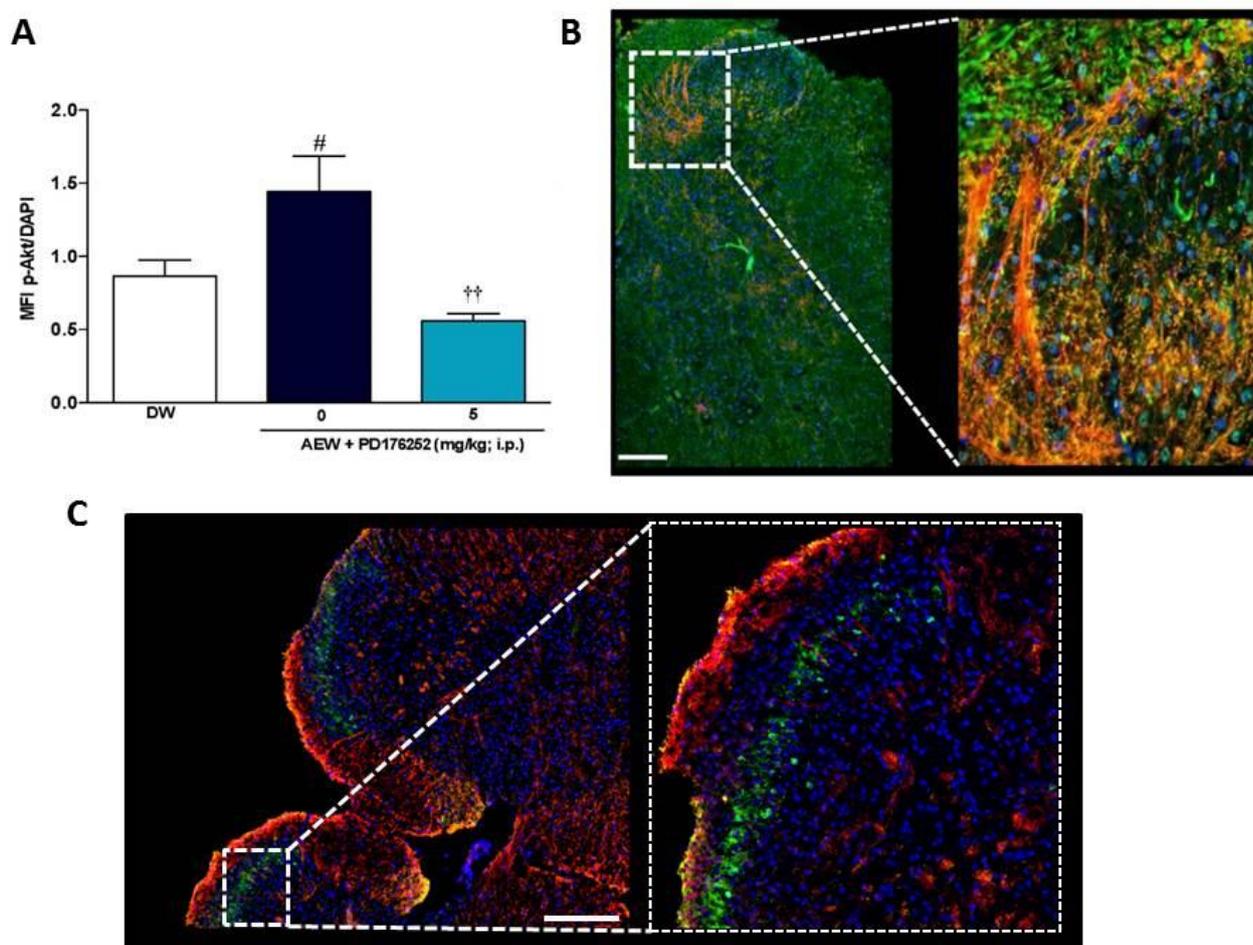


Figura suplementar 3. Efeito do prurido crônico sobre a fosforilação de Akt. **(A)** Quantificação da média de intensidade de fluorescência (MFI) para p-Akt espinal de animais controle (DW) e com pele seca (AEW) tratados com veículo ou o antagonista de GRPR, PD176252 (5 mg/kg; i.p.). **(B)** Imagem representativa da medula espinhal de um camundongo com pele seca, demonstrando a co-expressão de GRPR (vermelho) e p-Akt (verde) nas lâminas I e V do corno dorsal da medula espinhal. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Aumentos originais: 40x (esquerda) e 100x (direita). Escala = 100 μ m. **(C)** Células que expressam GRPR (vermelho) são encontradas nas lâminas I e V, e não se sobrepõe com o marcador de lâmina II PKC γ (verde). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Aumentos originais: 40x (esquerda) e 100x (direita). Escala = 100 μ m. Cada coluna representa a média de 6-7 animais e as barras verticais representam o erro padrão da média. Significativo em comparação com [#]DW e com [†]AEW tratado com veículo. [#]P<0.05; ^{††}P< 0.01.

Com base no conjunto de dados obtidos, é possível sugerir, fortemente, que o GRPR e a p-Akt são expressos pelas terminações centrais dos neurônios aferentes do DRG. Para confirmar essa ideia, foram caracterizados os neurônios do DRG de animais tratados com água destilada ou que tiveram indução de pele seca. A análise utilizando citometria de fluxo demonstrou um aumento significativo das células que expressam p-Akt no DRG de camundongos com pele seca (% da população total), um efeito que foi revertido pelo bloqueio espinal de GRPR (Figura suplementar 4A). A média de intensidade de fluorescência (MFI) para p-Akt aumentou significativamente em neurônios do DRG que expressam GRPR (células p-Akt⁺ GRPR⁺ Tuj1⁺ GFAP⁻ CD45⁻), o que também teve redução significativa após o tratamento com antagonista de GRPR (Figura suplementar 4B). É interessante ressaltar que as células GRPR⁺p-Akt⁺ também são Tuj1⁺ (pan marcador neuronal) e não expressam CD45 (pan marcador de células imune) nem GFAP (marcador de astrócitos) (Figura suplementar 4C). Estes resultados destacam a importância da PI3K γ como mediadora *downstream* GRPR. Tais achados também apontam que as células da medula espinal GRPR⁺ são, ao menos em parte, neurônios aferentes do DRG. Foi demonstrado que a injeção intradérmica de GRP é capaz de induzir o comportamento de coçar em camundongos e que os níveis séricos de GRP estão diretamente relacionados ao prurido sentido por pacientes com dermatite atópica (Andoh et al., 2011, Kagami et al., 2013). Nós confirmamos os achados de que a injeção intradérmica de GRP induz comportamento de coçar e, adicionalmente, demonstramos que o tratamento com o inibidor seletivo de PI3K γ , AS605240, diminui significativamente os acessos de coceira (Figura suplementar 5).

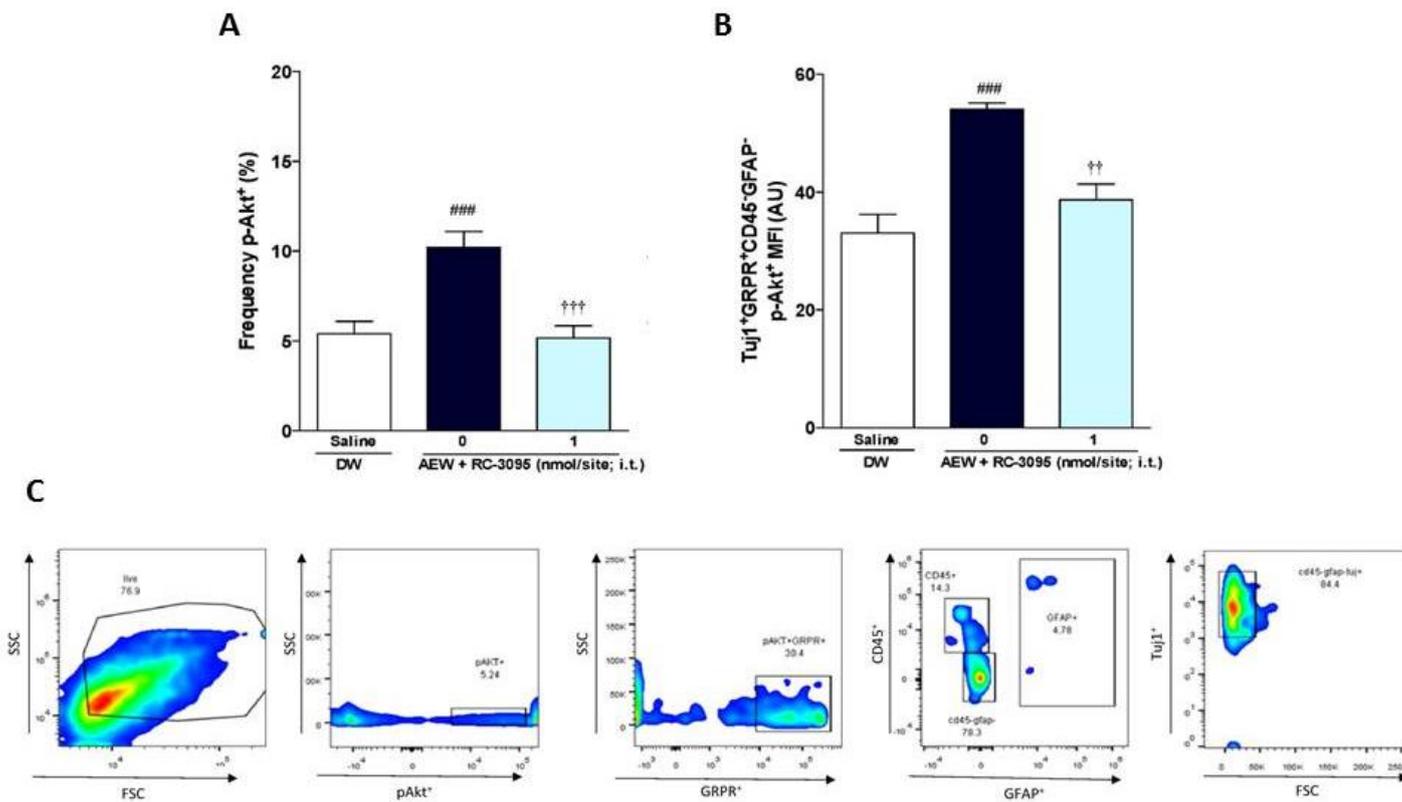


Figura suplementar 4. (A) Células que expressam p-Akt no DRG (% da população total) de camundongos controle ou que tiveram indução de pele seca tratados com veículo ou o antagonista de GRPR, RC-3095 (1nmol/sítio; i.t.). (B) Quantificação de MFI para p-Akt em neurônios do DRG que expressam GRPR de animais controle ou que tiveram indução de pele seca tratados com veículo ou RC-3095 (1nmol/sítio; i.t.). (C) Os neurônios do DRG foram caracterizados como células vivas (FSC e SSC), p-Akt⁺ GRPR⁺ CD45⁺ GFAP⁻ e Tuj1⁺. As colunas representam a média de 4 animais por grupo e as barras verticais representam o erro padrão da média. Significância em relação à #DW e com [†]AEW tratado com veículo. ^{###}P<0.001; ^{††}P<0.01; ^{†††}P<0.001.

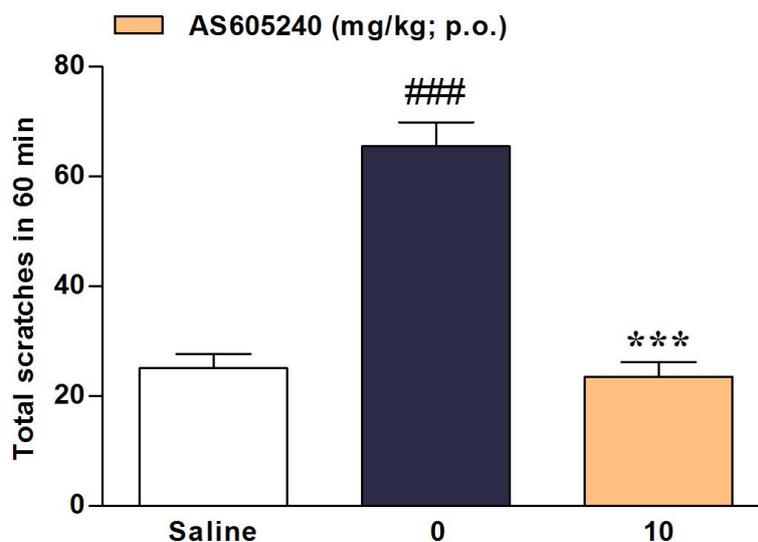


Figura suplementar 5. Efeito do inibidor seletivo de PI3K γ , AS605240, sobre o comportamento de coçar induzido por GRP (10 nmol/50 μ L; i.d.). Cada coluna representa a média de 6-8 animais e as barras verticais representam o erro padrão da média. Significância em relação à injeção de #solução salina e *GRP tratado com veículo. ###P<0.001; +++P<0.001.

Este trabalho confirma a hipótese inicial e demonstra que 1) o GRPR é um mediador importante para o prurido agudo e crônico, 2) muito provavelmente o GRPR é expresso pelos terminais periféricos e centrais de aferentes nociceptivos do DRG, 3) o prurido induzido pela ativação de GRPR é dependente da via da PI3K γ /Akt e 4) a PI3K γ pode ser um alvo farmacológico atrativo para aliviar o prurido mediado por GRPR.

5. PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão de GRPR e p-Akt nos nervos da pele.
- Investigar o papel do GRPR em outros modelos crônicos, como o prurido induzido por dermatite atópica ou dermatite de contato.
- Estudar a ativação da via PI3K γ /Akt em outros modelos crônicos, como o prurido induzido por dermatite atópica ou dermatite de contato.
- Dosar GRP e tentar identificar sua fonte de liberação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akiyama T.,Carstens M.I.,Ikoma A.,Cevikbas F.,Steinhoff M. e Carstens E. (2012). "Mouse model of touch-evoked itch (alloknesis)." J Invest Dermatol **132**(7): 1886-1891.

Andoh T.,Kuwazono T.,Lee J.B. e Kuraishi Y. (2011). "Gastrin-releasing peptide induces itch-related responses through mast cell degranulation in mice." Peptides **32**(10): 2098-2103.

Azzi J.,Moore R.F.,Elyaman W.,Mounayar M.,El Haddad N.,Yang S., et al. (2012). "The novel therapeutic effect of phosphoinositide 3-kinase-gamma inhibitor AS605240 in autoimmune diabetes." Diabetes **61**(6): 1509-1518.

Barber D.F.,Bartolome A.,Hernandez C.,Flores J.M.,Redondo C.,Fernandez-Arias C., et al. (2005). "PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus." Nat Med **11**(9): 933-935.

Binder A.,Koroschetz J. e Baron R. (2008). "Disease mechanisms in neuropathic itch." Nat Clin Pract Neurol **4**(6): 329-337.

Boehncke W.H. e Schon M.P. (2015). "Psoriasis." Lancet **386**(9997): 983-994.

Brezinski E.A.,Dhillon J.S. e Armstrong A.W. (2015). "Economic Burden of Psoriasis in the United States: A Systematic Review." JAMA Dermatol **151**(6): 651-658.

Brock C.,Schaefer M.,Reusch H.P.,Czupalla C.,Michalke M.,Spicher K., et al. (2003). "Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma." J Cell Biol **160**(1): 89-99.

Camps M.,Ruckle T.,Ji H.,Ardissone V.,Rintelen F.,Shaw J., et al. (2005). "Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis." Nat Med **11**(9): 936-943.

Carnevale D.,Vecchione C.,Mascio G.,Esposito G.,Cifelli G.,Martinello K., et al. (2012). "PI3Kgamma inhibition reduces blood pressure by a vasorelaxant Akt/L-type calcium channel mechanism." Cardiovasc Res **93**(1): 200-209.

Chiang H.C.,Huang V. e Cornelius L.A. (2011). "Cancer and itch." Semin Cutan Med Surg **30**(2): 107-112.

Comerford I.,Litchfield W.,Kara E. e McColl S.R. (2012). "PI3Kgamma drives priming and survival of autoreactive CD4(+) T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis." PLoS One **7**(9): e45095.

Costa R.,Manjavachi M.N.,Motta E.M.,Marotta D.M.,Juliano L.,Torres H.A., et al. (2010). "The role of kinin B1 and B2 receptors in the scratching behaviour induced by proteinase-activated receptor-2 agonists in mice." Br J Pharmacol **159**(4): 888-897.

- Czepielewski R.S.,Porto B.N.,Rizzo L.B.,Roesler R.,Abujamra A.L.,Pinto L.G., et al. (2012). "Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(2): 547-552.
- Davidson S. e Giesler G.J. (2010). "The multiple pathways for itch and their interactions with pain." Trends Neurosci **33**(12): 550-558.
- Engelman J.A.,Luo J. e Cantley L.C. (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." Nat Rev Genet **7**(8): 606-619.
- Ferrandi C.,Ardissone V.,Ferro P.,Rückle T.,Zaratin P.,Ammannati E., et al. (2007). "Phosphoinositide 3-kinase gamma inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment." J Pharmacol Exp Ther **322**(3): 923-930.
- Fougerat A.,Gayral S.,Gourdy P.,Schambourg A.,Ruckle T.,Schwarz M.K., et al. (2008). "Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes." Circulation **117**(10): 1310-1317.
- Fröjdö S.,Cozzone D.,Vidal H. e Pirola L. (2007). "Resveratrol is a class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor." Biochem J **406**(3): 511-518.
- Galluzzo M.,Ciraolo E.,Lucattelli M.,Hoxha E.,Ulrich M.,Campa C.C., et al. (2015). "Genetic Deletion and Pharmacological Inhibition of PI3K gamma Reduces Neutrophilic Airway Inflammation and Lung Damage in Mice with Cystic Fibrosis-Like Lung Disease." Mediators Inflamm **2015**: 545417.
- Gharbi S.I.,Zvelebil M.J.,Shuttleworth S.J.,Hancox T.,Saghir N.,Timms J.F., et al. (2007). "Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002." Biochem J **404**(1): 15-21.
- Gonzalez N.,Moody T.W.,Igarashi H.,Ito T. e Jensen R.T. (2008). "Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **15**(1): 58-64.
- Guttman-Yassky E.,Nogales K.E. e Krueger J.G. (2011). "Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts." J Allergy Clin Immunol **127**(5): 1110-1118.
- Han L.,Ma C.,Liu Q.,Weng H.J.,Cui Y.,Tang Z., et al. (2012). "A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch." Nat Neurosci.
- Han S.K.,Mancino V. e Simon M.I. (2006). "Phospholipase Cbeta 3 mediates the scratching response activated by the histamine H1 receptor on C-fiber nociceptive neurons." Neuron **52**(4): 691-703.
- Hashiro M. e Okumura M. (1997). "Anxiety, depression and psychosomatic symptoms in patients with atopic dermatitis: comparison with normal controls and among groups of different degrees of severity." J Dermatol Sci **14**(1): 63-67.

Hawkins P.T. e Stephens L.R. (2015). "PI3K signalling in inflammation." Biochim Biophys Acta **1851**(6): 882-897.

Hawkins P.T. e Stephens L.R. (2007). "PI3Kgamma is a key regulator of inflammatory responses and cardiovascular homeostasis." Science **318**(5847): 64-66.

Ikoma A.,Steinhoff M.,Stander S.,Yosipovitch G. e Schmelz M. (2006). "The neurobiology of itch." Nat Rev Neurosci **7**(7): 535-547.

Imamachi N.,Park G.H.,Lee H.,Anderson D.J.,Simon M.I.,Basbaum A.I., et al. (2009). "TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(27): 11330-11335.

Ishola T.A.,Kang J.,Qiao J.,Evers B.M. e Chung D.H. (2007). "Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of gastrin-releasing peptide-induced cell cycle progression in neuroblastoma cells." Biochim Biophys Acta **1770**(6): 927-932.

Ito K.,Caramori G. e Adcock I.M. (2007). "Therapeutic potential of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in inflammatory respiratory disease." J Pharmacol Exp Ther **321**(1): 1-8.

Jeffry J.,Kim S. e Chen Z.F. (2011). "Itch signaling in the nervous system." Physiology (Bethesda) **26**(4): 286-292.

Jensen R.T.,Battey J.F.,Spindel E.R. e Benya R.V. (2008). "International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states." Pharmacol Rev **60**(1): 1-42.

Ji R.R.,Kohno T.,Moore K.A. e Woolf C.J. (2003). "Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?" Trends Neurosci **26**(12): 696-705.

Johanek L.M.,Meyer R.A.,Hartke T.,Hobelmann J.G.,Maine D.N.,LaMotte R.H., et al. (2007). "Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch." J Neurosci **27**(28): 7490-7497.

Kagami S.,Sugaya M.,Suga H.,Morimura S.,Kai H.,Ohmatsu H., et al. (2013). "Serum gastrin-releasing peptide levels correlate with pruritus in patients with atopic dermatitis." J Invest Dermatol **133**(6): 1673-1675.

Kardon A.P.,Polgar E.,Hachisuka J.,Snyder L.M.,Cameron D.,Savage S., et al. (2014). "Dynorphin acts as a neuromodulator to inhibit itch in the dorsal horn of the spinal cord." Neuron **82**(3): 573-586.

Kini S.P.,DeLong L.K.,Veledar E.,McKenzie-Brown A.M.,Schaufele M. e Chen S.C. (2011). "The impact of pruritus on quality of life: the skin equivalent of pain." Arch Dermatol **147**(10): 1153-1156.

Kong D. e Yamori T. (2007). "ZSTK474 is an ATP-competitive inhibitor of class I phosphatidylinositol 3 kinase isoforms." Cancer Sci **98**(10): 1638-1642.

LaMotte R.H., Dong X. e Ringkamp M. (2014). "Sensory neurons and circuits mediating itch." Nat Rev Neurosci **15**(1): 19-31.

Leinders M., Koehn F.J., Bartok B., Boyle D.L., Shubayev V., Kalcheva I., et al. (2014). "Differential distribution of PI3K isoforms in spinal cord and dorsal root ganglia: potential roles in acute inflammatory pain." Pain **155**(6): 1150-1160.

Liu T., Berta T., Xu Z.Z., Park C.K., Zhang L., Lu N., et al. (2012). "TLR3 deficiency impairs spinal cord synaptic transmission, central sensitization, and pruritus in mice." J Clin Invest **122**(6): 2195-2207.

Liu T. e Ji R.R. (2012). "Oxidative stress induces itch via activation of transient receptor potential subtype ankyrin 1 in mice." Neurosci Bull **28**(2): 145-154.

Liu T., Xu Z.Z., Park C.K., Berta T. e Ji R.R. (2010). "Toll-like receptor 7 mediates pruritus." Nat Neurosci **13**(12): 1460-1462.

Liu X.Y., Liu Z.C., Sun Y.G., Ross M., Kim S., Tsai F.F., et al. (2011). "Unidirectional cross-activation of GRPR by MOR1D uncouples itch and analgesia induced by opioids." Cell **147**(2): 447-458.

Liu X.Y., Wan L., Huo F.Q., Barry D.M., Li H., Zhao Z.Q., et al. (2014). "B-type natriuretic peptide is neither itch-specific nor functions upstream of the GRP-GRPR signaling pathway." Mol Pain **10**: 4.

Majumdar I.D. e Weber H.C. (2011). "Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **18**(1): 68-74.

Marone R., Cmiljanovic V., Giese B. e Wymann M.P. (2008). "Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy." Biochim Biophys Acta **1784**(1): 159-185.

Matterne U., Apfelbacher C.J., Vogelgsang L., Loerbroks A. e Weisshaar E. (2013). "Incidence and determinants of chronic pruritus: a population-based cohort study." Acta Derm Venereol **93**(5): 532-537.

McDonald T.J., Jornvall H., Nilsson G., Vagne M., Ghatei M., Bloom S.R., et al. (1979). "Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue." Biochem Biophys Res Commun **90**(1): 227-233.

McMahon S.B. e Koltzenburg M. (1992). "Itching for an explanation." Trends Neurosci **15**(12): 497-501.

Merali Z., McIntosh J. e Anisman H. (1999). "Role of bombesin-related peptides in the control of food intake." Neuropeptides **33**(5): 376-386.

Metz M.,Grundmann S. e Stander S. (2011). "Pruritus: an overview of current concepts." Vet Dermatol **22**(2): 121-131.

Mishra S.K. e Hoon M.A. (2013). "The cells and circuitry for itch responses in mice." Science **340**(6135): 968-971.

Miyamoto T.,Nojima H.,Shinkado T.,Nakahashi T. e Kuraishi Y. (2002). "Itch-associated response induced by experimental dry skin in mice." Jpn J Pharmacol **88**(3): 285-292.

Miyamoto T. e Patapoutian A. (2011). "Why does morphine make you itch?" Cell **147**(2): 261-262.

Morita T.,McClain S.P.,Batia L.M.,Pellegrino M.,Wilson S.R.,Kienzler M.A., et al. (2015). "HTR7 Mediates Serotonergic Acute and Chronic Itch." Neuron **87**(1): 124-138.

Nattkemper L.A.,Zhao Z.Q.,Nichols A.J.,Papoiu A.D.,Shively C.A.,Chen Z.F., et al. (2013). "Over-Expression of the Gastrin-Releasing Peptide in Cutaneous Nerve Fibers and its Receptor in Spinal Cord in Primates with Chronic Itch." J Invest Dermatol **133**(10): 2489–2492.

Niemeier V.,Kupfer J. e Gieler U. (2000). "Observations during an itch-inducing lecture." Dermatol. Psychosom. **1**(1): 15-18.

O'Neill J.L.,Chan Y.H.,Rapp S.R. e Yosipovitch G. (2011). "Differences in itch characteristics between psoriasis and atopic dermatitis patients: results of a web-based questionnaire." Acta Derm Venereol **91**(5): 537-540.

Ohashi P.S. e Woodgett J.R. (2005). "Modulating autoimmunity: pick your PI3 kinase." Nat Med **11**(9): 924-925.

Papoiu A.D.,Wang H.,Coghill R.C.,Chan Y.H. e Yosipovitch G. (2011). "Contagious itch in humans: a study of visual 'transmission' of itch in atopic dermatitis and healthy subjects." Br J Dermatol **164**(6): 1299-1303.

Passos G.F.,Figueiredo C.P.,Prediger R.D.,Silva K.A.,Siqueira J.M.,Duarte F.S., et al. (2010). "Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1-40 peptide in mice." Brain Behav Immun **24**(3): 493-501.

Patel K.N. e Dong X. (2010). "An itch to be scratched." Neuron **68**(3): 334-339.

Patel K.N. e Dong X. (2011). "Itch: Cells, Molecules, and Circuits." ACS Chem Neurosci **2**(1): 17-25.

Patel O.,Shulkes A. e Baldwin G.S. (2006). "Gastrin-releasing peptide and cancer." Biochim Biophys Acta **1766**(1): 23-41.

Patel T., Ishiiji Y. e Yosipovitch G. (2007). "Nocturnal itch: why do we itch at night?" Acta Derm Venereol **87**(4): 295-298.

Patricio E.S., Costa R., Figueiredo C.P., Gers-Barlag K., Bicca M.A., Manjavachi M.N., et al. (2015). "Mechanisms Underlying the Scratching Behavior Induced by the Activation of Proteinase-Activated Receptor-4 in Mice." J Invest Dermatol **135**(10): 2484-2491.

Pereira P.J., Lazarotto L.F., Leal P.C., Lopes T.G., Morrone F.B. e Campos M.M. (2011). "Inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase gamma reduces pruriceptive, inflammatory, and nociceptive responses induced by trypsin in mice." Pain **152**(12): 2861-2869.

Pereira P.J.S., Machado G.D.B., Danesi G.M., Canevese F.F., Reddy V.B., Pereira T.C.B., et al. (2015). "GRPR/PI3K γ : Partners in Central Transmission of Itch." J Neurosci **35**(49): 16272-16281.

Pomel V., Klicic J., Covini D., Church D.D., Shaw J.P., Roulin K., et al. (2006). "Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase gamma." J Med Chem **49**(13): 3857-3871.

Potenzieri C. e Udem B.J. (2012). "Basic mechanisms of itch." Clin Exp Allergy **42**(1): 8-19.

Rodrigues D.H., Vilela M.C., Barcelos L.S., Pinho V., Teixeira M.M. e Teixeira A.L. (2010). "Absence of PI3Kgamma leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **222**(1-2): 90-94.

Roller A., Perino A., Dapavo P., Soro E., Okkenhaug K., Hirsch E., et al. (2012). "Blockade of phosphatidylinositol 3-kinase PI3Kdelta or PI3Kgamma reduces IL-17 and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis." J Immunol **189**(9): 4612-4620.

Rommel C., Camps M. e Ji H. (2007). "PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?" Nat Rev Immunol **7**(3): 191-201.

Ross S.E. (2011). "Pain and itch: insights into the neural circuits of aversive somatosensation in health and disease." Curr Opin Neurobiol **21**(6): 880-887.

Ross S.E., Mardinly A.R., McCord A.E., Zurawski J., Cohen S., Jung C., et al. (2010). "Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in Bhlhb5 mutant mice." Neuron **65**(6): 886-898.

Roy P., Kalra N., Prasad S., George J. e Shukla Y. (2009). "Chemopreventive potential of resveratrol in mouse skin tumors through regulation of mitochondrial and PI3K/AKT signaling pathways." Pharm Res **26**(1): 211-217.

Ruckle T., Schwarz M.K. e Rommel C. (2006). "PI3Kgamma inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'?" Nat Rev Drug Discov **5**(11): 903-918.

Saito Y., Takeda M., Nishikawa J., Konno Y., Tamaki M., Itoga M., et al. (2014). "The effect of pharmacological PI3Kgamma inhibitor on eotaxin-induced human eosinophil functions." Pulm Pharmacol Ther **27**(2): 164-169.

Schmelz M., Schmidt R., Bickel A., Handwerker H.O. e Torebjork H.E. (1997). "Specific C-receptors for itch in human skin." J Neurosci **17**(20): 8003-8008.

Schmelz M., Schmidt R., Weidner C., Hilliges M., Torebjork H.E. e Handwerker H.O. (2003). "Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens." J Neurophysiol **89**(5): 2441-2448.

Schut C., Grossman S., Gieler U., Kupfer J. e Yosipovitch G. (2015). "Contagious itch: what we know and what we would like to know." Front Hum Neurosci **9**: 57.

Sheehan-Dare R.A., Henderson M.J. e Cotterill J.A. (1990). "Anxiety and depression in patients with chronic urticaria and generalized pruritus." Br J Dermatol **123**(6): 769-774.

Smirnova N.F., Gayral S., Pedros C., Loirand G., Vaillant N., Malet N., et al. (2014). "Targeting PI3Kgamma activity decreases vascular trauma-induced intimal hyperplasia through modulation of the Th1 response." J Exp Med **211**(9): 1779-1792.

Solorzano C., Villafuerte D., Meda K., Cevikbas F., Braz J., Sharif-Naeini R., et al. (2015). "Primary afferent and spinal cord expression of gastrin-releasing peptide: message, protein, and antibody concerns." J Neurosci **35**(2): 648-657.

Stander S., Steinhoff M., Schmelz M., Weisshaar E., Metzger D. e Luger T. (2003). "Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch." Arch Dermatol **139**(11): 1463-1470.

Stander S., Weisshaar E. e Luger T.A. (2008). "Neurophysiological and neurochemical basis of modern pruritus treatment." Exp Dermatol **17**(3): 161-169.

Stander S., Weisshaar E., Mettang T., Szepietowski J.C., Carstens E., Ikoma A., et al. (2007). "Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch." Acta Derm Venereol **87**(4): 291-294.

Steinhoff M., Bienenstock J., Schmelz M., Maurer M., Wei E. e Biro T. (2006). "Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus." J Invest Dermatol **126**(8): 1705-1718.

Sun Y.G. e Chen Z.F. (2007). "A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord." Nature **448**(7154): 700-703.

Sun Y.G., Zhao Z.Q., Meng X.L., Yin J., Liu X.Y. e Chen Z.F. (2009). "Cellular basis of itch sensation." Science **325**(5947): 1531-1534.

Tey H.L. e Yosipovitch G. (2011). "Targeted treatment of pruritus: a look into the future." Br J Dermatol **165**(1): 5-17.

Twycross R.,Greaves M.W.,Handwerker H.,Jones E.A.,Libretto S.E.,Szepietowski J.C., et al. (2003). "Itch: scratching more than the surface." QJM **96**(1): 7-26.

Vadas O.,Burke J.E.,Zhang X.,Berndt A. e Williams R.L. (2011). "Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases." Sci Signal **4**(195): re2.

Vos T.,Flaxman A.D.,Naghavi M.,Lozano R.,Michaud C.,Ezzati M., et al. (2012). "Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." Lancet **380**(9859): 2163-2196.

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

Weber H.C. (2009). "Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **16**(1): 66-71.

Weisshaar E. e Dalgard F. (2009). "Epidemiology of itch: adding to the burden of skin morbidity." Acta Derm Venereol **89**(4): 339-350.

Weisshaar E.,Grull V.,Konig A.,Schweinfurth D.,Diepgen T.L. e Eckart W.U. (2009). "The symptom of itch in medical history: highlights through the centuries." Int J Dermatol **48**(12): 1385-1394.

Wilson S.R.,The L.,Batia L.M.,Beattie K.,Katibah G.E.,McClain S.P., et al. (2013). "The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch." Cell **155**(2): 285-295.

Wymann M.P.,Bjorklof K.,Calvez R.,Finan P.,Thomast M.,Trifilieff A., et al. (2003). "Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy." Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 275-280.

Yosipovitch G. (2011). "Chronic Itch- A Disease State on Its Own Right." J Clin Exp Dermatol Res. **2**(2).

Yosipovitch G. e Bernhard J.D. (2013). "Clinical practice. Chronic pruritus." N Engl J Med **368**(17): 1625-1634.

Yosipovitch G.,Greaves M.W. e Schmelz M. (2003). "Itch." Lancet **361**(9358): 690-694.

Yosipovitch G. e Samuel L.S. (2008). "Neuropathic and psychogenic itch." Dermatol Ther **21**(1): 32-41.

Zhao Z.Q.,Huo F.Q.,Jeffry J.,Hampton L.,Demehri S.,Kim S., et al. (2013). "Chronic itch development in sensory neurons requires BRAF signaling pathways." J Clin Invest **123**(11): 4769-4780.

Zhao Z.Q.,Liu X.Y.,Jeffry J.,Karunaratne W.K.,Li J.L.,Munanairi A., et al. (2014a). "Descending control of itch transmission by the serotonergic system via 5-HT1A-facilitated GRP-GRPR signaling." Neuron **84**(4): 821-834.

Zhao Z.Q.,Wan L.,Liu X.Y.,Huo F.Q.,Li H.,Barry D.M., et al. (2014b). "Cross-inhibition of NMBR and GRPR signaling maintains normal histaminergic itch transmission." J Neurosci **34**(37): 12402-12414.

Zhuang Z.Y.,Xu H.,Clapham D.E. e Ji R.R. (2004). "Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization." J Neurosci **24**(38): 8300-8309.

ANEXOS

ANEXO I

Carta de Aprovação da Comissão de Ética para o
Uso de Animais

CEUA PUCRS: 13/00338



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 44/13 - CEUA

Porto Alegre, 24 de junho de 2013.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00338, intitulado **“ENVOLVIMENTO DA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE γ (PI3K γ) NAS ALTERAÇÕES PRURICEPTIVAS MEDIADAS PELA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA (GRP-R) EM CAMUNDONGOS”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.

Prof^a. Maria Martha Campos

FABIO 

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO II

Parecer do Orientador no exterior pelo período
do Doutorado Sanduíche

Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts
General Hospital and Harvard Medical School, EUA



Department of Dermatology
Cutaneous Biology Research Center
Building 149, 13th Street
Charlestown, Massachusetts 02129
Tel: 617.726.4439, Fax: 617.726.4453
Email: ethan.lerner@cbr2.mgh.harvard.edu

Ethan A. Lerner, M.D., Ph.D.
Associate Professor

February 10, 2015

Letter of Evaluation

To: CAPES

Re: Mrs. Paula Juliana Seadi Pereira

Dear CAPES,

I am delighted to report that Mrs. Paula Juliana Seadi Pereira has been an actively contributing member of my laboratory at Massachusetts General Hospital/Harvard Medical School for the past year. She has been working on her Ph.D. thesis in conjunction with me, and her mentor at PUCRS, Professor Maria Martha Campos.

We study the basic mechanisms of itch. We seek to decipher the signaling pathways that underlie this sensation. Itch is an important and common problem. It is a component of many inflammatory skin diseases and systemic ones including cancer, chronic kidney disease and liver disease. It is now understood that the effect of itch on quality of life is equivalent to that for pain. There are few effective therapies for itch. Understanding how itch works will lead to targeted therapies to alleviate this symptom that can ruin people's lives.

Mrs. Pereira project is titled: "The role of PI3Ky activation in GRP-elicited scratching behavior". We have the tools to address this area and Mrs. Pereira has been making excellent progress. She has already co-authored a commentary in *Neuron*. In addition to progress on her Ph.D. work, she has been an excellent collaborator with other laboratory members. She is thus poised to be a co-author on manuscripts beyond the focus of her specific project.

Sincerely,

Ethan A. Lerner

Dr. Ethan A Lerner, MD, PhD

ANEXO III

Interneurons Scratch a Itch

Paula Juliana Sadi Pereira & Ethan A. Lerner

Comentário publicado na revista *Neuron*, 2014.
(Realizado no período do Doutorado Sanduíche)

may be developed to effectively treat neurological diseases, particularly those caused by cellular dysfunction or tissue injury.

REFERENCES

Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., et al. (2010). *Cell Stem Cell* 7, 744–758.

Bolli, M.H., Lescop, C., and Nayler, O. (2011). *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 726–757.

Carlén, M., Meletis, K., Göritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabé-Heider, F., Yeung, M.S.Y., Naldini, L., et al. (2009). *Nat. Neurosci.* 12, 259–267.

Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., DeLeo, A.M., Pastrana, E., and

Doetsch, F. (2014). *Neuron* 82, this issue, 545–559.

Coskun, V., Wu, H., Bianchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J.C., Hutnick, L., Krueger, R.C., Jr., Fan, G., et al. (2008). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1026–1031.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). *Cell* 97, 703–716.

Giachino, C., Basak, O., Lugert, S., Knuckles, P., Obernier, K., Fiorelli, R., Frank, S., Raineteau, O., Alvarez-Buylla, A., and Taylor, V. (2014). *Stem Cells* 32, 70–84.

Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). *Science* 264, 1145–1148.

Merkle, F.T., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 17528–17532.

Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). *Cell Stem Cell* 3, 265–278.

Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994). *Neuron* 13, 1071–1082.

Pastrana, E., Cheng, L.-C., and Doetsch, F. (2009). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6387–6392.

Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.-M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). *Cell Stem Cell* 3, 289–300.

Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). *Cell Stem Cell* 3, 279–288.

van den Berge, S.A., Middeldorp, J., Zhang, C.E., Curtis, M.A., Leonard, B.W., Mastroeni, D., Voorn, P., van de Berg, W.D.J., Huitinga, I., and Hol, E.M. (2010). *Aging Cell* 9, 313–326.

Interneurons Scratch an Itch

Paula Juliana Sedi Pereira^{1,2} and Ethan A. Lerner^{1,*}

¹Cutaneous Biology Research Center, Department of Dermatology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA

²Postgraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

*Correspondence: elerner@partners.org
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.026>

Itch is immensely frustrating. Most studies focus on the cause of itch. In this issue of *Neuron*, Kardon et al. (2014) find that itch can be modulated by inhibitory neurons that produce dynorphin, an endogenous agonist of κ -opioid receptors.

Scientific investigations can be likened to scratch tickets. While individual experiments that we perform may not pan out, the study by Kardon et al. (2014) in this issue of *Neuron* is a winner. These investigators characterize a population of spinal inhibitory neurons and demonstrate that dynorphin, released from these neurons, is a backscratcher responsible for modulating itch (Figure 1).

Itch, also referred to as pruritus, may have evolved as a protective mechanism against threats from arthropods, but it is a prominent feature of inflammatory skin disease and ruins the lives of patients with chronic renal failure, liver disease, and certain malignancies. Its impact on quality of life is comparable to that of

pain (Kini et al., 2011). It has been suggested that itch be considered a disease (Yosipovitch, 2011). Drugs with itch as an approved indication are limited to antihistamines and topical steroids and have limited effectiveness. It is recognized that neuromodulators can be remarkably effective in treating some itches and that scratching may provide temporary relief and feel pleasurable, suggesting that complex neurocircuitry and neuromodulatory mechanisms are involved. Accordingly, endogenous molecules may have the potential to reduce the sensation of itch.

Understanding the underlying mechanisms of itch is an intense focus of investigation. Recent advances include the

identification of a series of itch-related ligands and receptors as well as peripheral neurons and spinal afferents specialized in transmitting this sensation and distinguishing it from pain (Han et al., 2013; Mishra and Hoon, 2013). It is recognized that itch and pain are part of a complex family dynamic. A few examples are scratching, which alleviates itch but is a noxious stimulus, μ -opioids, which relieve pain but induce itch, and the inhibition of glutamergic transmission from nociceptors, which reduces pain but increases scratching (Lagerström et al., 2010; Liu et al., 2010).

A key role in sensory processes has been suggested for inhibitory circuits in the spinal cord, consistent with the

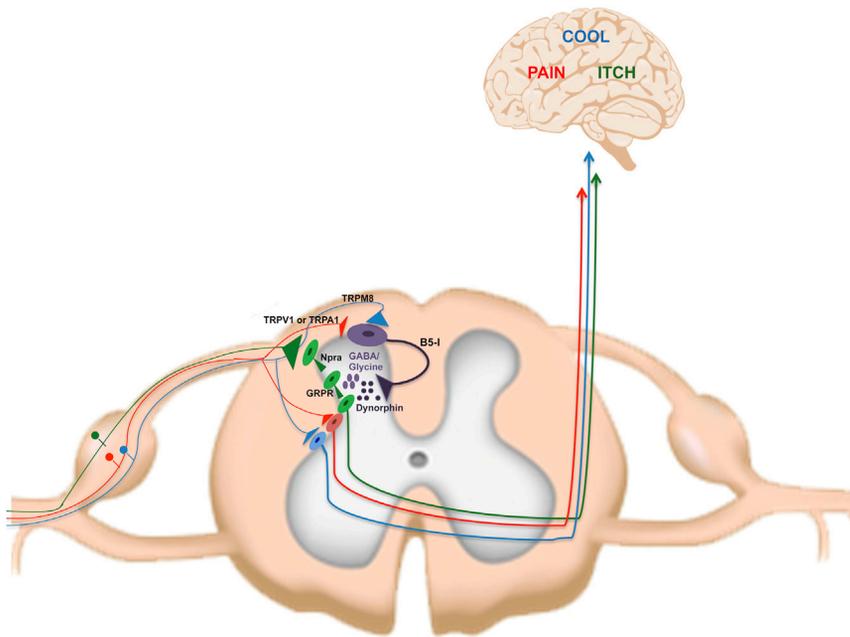


Figure 1. Interneurons that Release Dynorphin Modulate Itch

Neurons that respond to itch, cold, and noxious stimuli innervate and are modulated by B5-I interneurons that produce dynorphin. Capsaicin, mustard oil, and menthol activate TRPV1, TRPA1, and TRPM8, respectively. B5-I, inhibitory neurons that are a focus of the report to which this Preview is directed. GRPR, gastrin-releasing peptide receptor. Npra, natriuretic peptide receptor A is the receptor for the B-type natriuretic peptide BNP, also known as Nppb. Image modified and reproduced under CC-BY license: <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/us/legalcode>.

relationship between itch and pain. Deletion of the neuronal-specific transcription factor basic helix-loop-helix protein 5 (*Bhlhb5*) resulted in the loss of a subset of inhibitory interneurons, termed B5-I neurons, within the dorsal horn (Ross et al., 2010). These mice scratched without provocation and developed skin lesions as a result. They were additionally sensitive to pruritic agents, whereas nociceptive responses to mechanical, thermal, or chemical stimuli remained unaffected.

A hallmark of itch is that it may be alleviated by counterstimuli, consistent with the existence of inhibitory control pathways. The neural mechanisms and neuromodulators underlying this phenomenon have not been identified definitively. The report from Kardon et al. (2014) represents an important step in addressing this knowledge gap. Dynorphin is a κ -opioid neuropeptide expressed in the CNS. Its precursor is preprodynorphin. Dynorphin is stored in large dense-core vesicles and is released from nerve terminals, selectively acting on κ -opioid receptors (KORs) present in the

peripheral nervous system and CNS. Activation of KORs, which couple to G_i/G_o , leads to a decrease in synaptic transmission (Knoll and Carlezon, 2010). It was reported previously that galanin-expressing inhibitory interneurons coexpress dynorphin while also being a source of KORs in the dorsal horn (Sardella et al., 2011).

Kardon et al. (2014) find that B5-I neurons comprise a specific neurochemical population of inhibitory interneurons in the dorsal horn that inhibits itch. Using immunostaining, they found that B5-I neurons coexpress dynorphin and the inhibitory neuropeptide galanin. These mice also express another hallmark of inhibitory neurons, the somatostatin receptor SST_{2A} . Mice in which *Bhlhb5* had been knocked out showed almost a complete loss of galanin- and dynorphin-expressing inhibitory interneurons, a marked decrease in SST_{2A} -expressing neurons, but no change in SST_{2A} -negative neurons.

The antipruritic effect of κ -opioid agonists was first identified in the early 1980s (reviewed by Cowan and Gmerek, 1986). These observations from almost

three decades ago continue to be supported by the current finding that scratching behavior, induced by a variety of pruritogens, was inhibited after the administration of κ -opioid agonists, especially to *Bhlhb5*^{-/-} mice. Kardon et al. (2014) hypothesized that the extensive scratching in these knockout mice was due to reduced κ -opioid signaling associated with the loss of dynorphin-producing cells in the spinal cord. A critical question then arises: is the elevated itch in *Bhlhb5*^{-/-} mice due to the loss of dynorphin, the lack of fast synaptic inhibition, or both? To address this question, Kardon et al. (2014) examined mice in which the dynorphin precursor had been knocked out (*PPD*^{-/-}). *PPD*^{-/-} mice have not been reported to scratch spontaneously. It might be expected that *PPD*^{-/-} mice would scratch more than wild-type controls when itch is induced by pruritogens, indicating an essential role for dynorphin in pruritic inhibitory circuits. However, *PPD*^{-/-} mice show normal levels of scratching when compared to wild-type animals. This result suggests that the abnormal itch phenotype observed in *Bhlhb5*^{-/-} animals is not completely dependent on dynorphin. This finding suggests that there is a degree of compensation for the loss of dynorphin in *PPD*^{-/-} mice, but not the loss of spinal neurons that produce dynorphin. Together, these results suggest a role for dynorphin in quelling acute and chronic itch but that fast inhibitory neurotransmitters, such as GABA and/or glycine, participate in the relief of acute itch by scratching.

Neuropathic itch, a type of chronic itch in people, is a particularly frustrating condition. Shingles, caused by reactivation of varicella in dorsal root ganglia, can cause long-lasting and intense neuropathic pain. It is less well-recognized that some victims suffer from an intense itch rather than pain. The treatment of neuropathic pain, and itch, is yielding somewhat to neuromodulators. As *Bhlhb5*^{-/-} mice scratch chronically, they may provide a model of neuropathic itch. Kardon et al. (2014) examined the capacity of κ -opioid agonists to relieve scratching in these mice. Two structurally unrelated κ -agonists, nalfurafine and U-50,488, were evaluated. Nalfurafine is approved in Japan for the treatment of itch associated

with chronic kidney disease and is currently being evaluated in the U.S. Nalfurafine and U-50,488 were delivered by intraperitoneal injection and reduced the time mice spent biting and/or licking skin lesions. Histamine and nonhistamine scratching, such as that evoked by chloroquine, is mediated by distinct primary afferents. Nalfurafine was known to reduce scratching evoked by histamine, a finding confirmed here. Nalfurafine and U-50,488 also reduced scratching from chloroquine. These results are consistent with a merging of histamine and nonhistamine neural responses. To confirm that the sensation of itch, and not nociceptive pain, was being evaluated, Kardon et al. (2014) employed the cheek model established by Shimada and LaMotte (2008). Capsaicin, which activates TrpV1 channels and is the active ingredient in hot peppers, generates pain and itch responses that can be distinguished in this model. Low doses of nalfurafine inhibited only the scratching response, implying a degree of selectivity with respect to the treatment of itch versus pain.

Intrathecal injection of κ -agonists or antagonists was used by Kardon et al. (2014) to delve into two additional questions. One question relates to the sequential path in which itch information is relayed. Such information is relayed from the periphery to the spinal cord by upstream Nppb-expressing neurons that communicate with downstream GRPR-expressing neurons in the spinal cord. The intrathecal injection of GRP is known to evoke scratching. When Kardon et al. (2014) coinjected GRP and nalfurafine, scratching was reduced. This result places the action of κ -agonists and, by inference, B5-I interneurons, downstream of GRPR neurons. A second question is whether blockade of KOR signaling would increase an itch-associated response. Intrathecal administration of κ -antago-

nists was used to answer this question in the affirmative as such compounds resulted in an increased behavioral response to chloroquine. These findings demonstrate the capacity of KOR signaling in the spinal cord to modulate itch up or down.

It is recognized that counterstimuli, including noxious stimuli, scratching, and cold, suppress itch. This suppression occurs through the activation of inhibitory pathways within the spinal cord (Bautista et al., 2014). B5-I interneurons are well positioned to be part of this milieu. To examine this issue further, Kardon et al. (2014) asked whether B5-I neurons receive input from primary afferents expressing TRPV1, TRPA1, and TRPM8, channels that are activated by the itch-inhibiting compounds capsaicin, mustard oil, and menthol, respectively. The answer, as tested using neurophysiologic techniques, was in the affirmative, and a behavioral model was used as a complementary approach. Specifically, the topical application of menthol decreased chloroquine-induced scratching behavior in wild-type mice but not in *Bhlhb5*^{-/-} mice. These findings are consistent with the concept that chemical counterstimuli that ameliorate scratching require B5-I neurons.

The findings in this paper provide a lead for additional directions. κ -opioid agonists have been reported to be helpful for certain itches. Why isn't their effect more general? What is the balance between KOR in the periphery and the spinal cord with respect to ameliorating itch? Might there be endogenous inhibitory mediators in addition to dynorphin that are yet not identified? And what is the role of fast synaptic transmission in modulating itch, as suggested by the observation that mice lacking dynorphin still scratch? Addressing these questions will hopefully pave

the way to new therapeutics for people suffering from itch.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from the NIH, R01AR057744, and LEO Pharma to E.A.L. and the Programa de Doutorado Sanduiche no Exterio, sponsored by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to P.J.S.P.

REFERENCES

Bautista, D.M., Wilson, S.R., and Hoon, M.A. (2014). *Nat. Neurosci.* 17, 175–182.

Cowan, A., and Gmerek, D.E. (1986). *Trends Pharmacol. Sci.* 7, 69–72.

Han, L., Ma, C., Liu, Q., Weng, H.J., Cui, Y., Tang, Z., Kim, Y., Nie, H., Qu, L., Patel, K.N., et al. (2013). *Nat. Neurosci.* 16, 174–182.

Kardon, A.P., Polgár, E., Hachisuka, J., Snyder, L.M., Cameron, D., Savage, S., Cai, X., Karnup, S., Fan, C.R., Hemenway, G.M., et al. (2014). *Neuron* 82, this issue, 573–586.

Kini, S.P., DeLong, L.K., Veleadar, E., McKenzie-Brown, A.M., Schaufele, M., and Chen, S.C. (2011). *Arch. Dermatol.* 147, 1153–1156.

Knoll, A.T., and Carlezon, W.A., Jr. (2010). *Brain Res.* 1314, 56–73.

Lagerström, M.C., Rogoz, K., Abrahamsen, B., Persson, E., Reinius, B., Nordenankar, K., Olund, C., Smith, C., Mendez, J.A., Chen, Z.F., et al. (2010). *Neuron* 68, 529–542.

Liu, Y., Abdel Samad, O., Zhang, L., Duan, B., Tong, Q., Lopes, C., Ji, R.R., Lowell, B.B., and Ma, Q. (2010). *Neuron* 68, 543–556.

Mishra, S.K., and Hoon, M.A. (2013). *Science* 340, 968–971.

Ross, S.E., Mardinly, A.R., McCord, A.E., Zurawski, J., Cohen, S., Jung, C., Hu, L., Mok, S.I., Shah, A., Savner, E.M., et al. (2010). *Neuron* 65, 886–898.

Sardella, T.C., Polgár, E., Garzillo, F., Furuta, T., Kaneko, T., Watanabe, M., and Todd, A.J. (2011). *Mol. Pain* 7, 76.

Shimada, S.G., and LaMotte, R.H. (2008). *Pain* 139, 681–687.

Yosipovitch, G. (2011). *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* 2, 102e.

11/12/2015

Rightslink® by Copyright Clearance Center

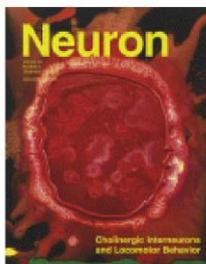


RightsLink®

Home

Account
Info

Help



Title: Interneurons Scratch an Itch
Author: Paula Juliana Seadi Pereira,Ethan A. Lerner
Publication: Neuron
Publisher: Elsevier
Date: 7 May 2014

Logged in as:
Paula Pereira

LOGOUT

Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Paula Pereira ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3766090035264
License date	Dec 11, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Neuron
Licensed content title	Interneurons Scratch an Itch
Licensed content author	Paula Juliana Seadi Pereira,Ethan A. Lerner
Licensed content date	7 May 2014
Licensed content volume number	82
Licensed content issue number	3
Number of pages	3
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	O prurido mediado pelo receptor para o peptídeo liberador de gastrina (GRPR) é dependente da via de sinalização PI3K/Akt
Expected completion date	Jan 2016
Estimated size (number of pages)	70
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD

ORDER MORE...

CLOSE WINDOW

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#)
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

ANEXO IV

E-mail recebido após submissão de artigo, como co-autora

Azimi E., Reddy V.B., Talbot S., Shade K.T.C., Anthony R.M., Pereira P.J.S and Lerner E.A.

Artigo submetido à revista *Nature Neuroscience*, 2015.
(Realizado no período do Doutorado Sanduíche)

De neurosci@us.nature.com

Data 05/10/2015 11:24:46

Para Pereira, Paula J.

Cc

Assunto NN-A54263 Receipt of New Paper by Nature Neuroscience

Dear Miss Pereira,

Please note that a Nature Neuroscience manuscript tracking system account has been created for you. This is because you are listed as a co-author on the manuscript "Substance P activates Mrgprs to provoke itch and a Mrgpr antagonist blocks itch and drug reactions" (reference number: NN-A54263), which was recently submitted to Nature Neuroscience.

Your account details are provided below. You will be required to set a password using the 'Forgot my login details' option.

Login: papereira

[Access your account](#)

The corresponding author is solely responsible for communicating with the journal and managing communication between co-authors. Please contact the corresponding author directly with any queries you may have related to this manuscript.

You can now use a single sign-on for all your accounts, view the status of all your manuscript submissions and reviews, access usage statistics for your published articles and download a record of your refereeing activity for the Nature journals. Please check your account regularly and ensure that we have your current contact information.

In addition, NPG encourages all authors and reviewers to associate an Open Researcher and Contributor Identifier (ORCID) to their account. ORCID is a community-based initiative that provides an open, non-proprietary and transparent registry of unique identifiers to help disambiguate research contributions.

Many thanks,

Adam Lipkin
Senior Editorial Assistant
Nature Neuroscience
212.726.9319

ANEXO V

Autorização do periódico *Journal of Neuroscience* para a utilização do manuscrito publicado como parte desta tese.

Dezembro de 2015

Permission request

jn permissions <jnpermissions@sfn.org>
Para: "paula.pereira@acad.pucrs.br" <paula.pereira@acad.pucrs.br>
Cc: "nejpsite@gmail.com" <nejpsite@gmail.com>

11 de dezembro de 2015 18:27

Dear Ms. Pereira,

Thank you for your email. Since you are using the paper for your doctoral thesis and are an author of the original paper, there will be no reuse fee. However, because the paper was published in 2015, we ask that your work not appear in another publication until the 6 month period from the original publishing date has passed. We also ask that you add proper citation noting the source.

Do not hesitate to contact us if you have any questions.

Best Wishes,

Grace

SfN Central Office

From: The Journal of Neuroscience
Sent: Friday, December 11, 2015 12:54 PM
To: jn permissions
Subject: FW: Permission request

From: Paula Pereira [<mailto:paula.pereira@acad.pucrs.br>]
Sent: Friday, December 11, 2015 12:46 PM
To: The Journal of Neuroscience <jn@sfn.org>; nejpsite@gmail.com
Subject: Permission request

[Texto das mensagens anteriores oculto]

ANEXO VI

Autorização para a utilização de figuras publicadas
pelos periódicos *ACS Chemical Neuroscience* e
Nature Reviews Immunology

Dezembro de 2015

13/12/2015

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Account
Info

Help

**Title:** Itch: Cells, Molecules, and Circuits**Author:** Kush N. Patel, Xinzhong Dong**Publication:** ACS Chemical Neuroscience**Publisher:** American Chemical Society**Date:** Jan 1, 2011

Copyright © 2011, American Chemical Society

Logged in as:

Paula Pereira

Account #:

3000982322

LOGOUT

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

13/12/2015

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Account
Info

Help



Title: PI3K Δ and PI3K γ : partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?

Author: Christian Rommel, Montserrat Camps and Hong Ji

Publication: Nature Reviews Immunology

Publisher: Nature Publishing Group

Date: Mar 1, 2007

Copyright © 2007, Rights Managed by Nature Publishing Group

Logged in as:

Paula Pereira

Account #:

3000982322

LOGOUT

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Paula Pereira ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3767261240112
License date	Dec 13, 2015
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Immunology
Licensed content title	PI3K Δ and PI3K γ : partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?
Licensed content author	Christian Rommel, Montserrat Camps and Hong Ji
Licensed content date	Mar 1, 2007
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Volume number	7
Issue number	3
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1 from the article will be modified and use as Figure 2 of the thesis
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	O prurido mediado pelo receptor para o peptídeo liberador de gastrina (GRPR) é dependente da via de sinalização PI3K γ /Akt
Expected completion date	Jan 2016
Estimated size (number of pages)	70
Total	0.00 USD

ORDER MORE...

CLOSE WINDOW

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com