

JANIANA RAÍZA JENTSCH MATIAS DE OLIVEIRA

ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV1 NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO NA
TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS TRATADOS COM INIBIDOR DA ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

CURITIBA
Fevereiro/2016

JANIANA RAÍZA JENTSCH MATIAS DE OLIVEIRA

ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV1 NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO
NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS TRATADOS COM INIBIDOR DA ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof. Dr. Eunice André.

CURITIBA
Fevereiro/2016

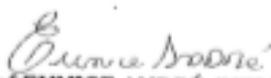


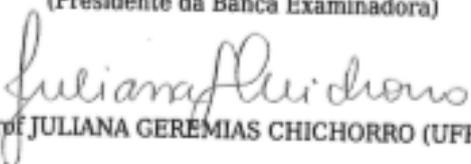
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e seis de Fevereiro de dois mil e dezesseis às 14:00 horas, na sala 03, Centro Politécnico, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **JANIANA RAIZA JENTSCH MATIAS DE OLIVEIRA** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada: "**Envolvimento do receptor TRPV1 no extravasamento plasmático na traqueia e brônquide ratos tratados com inibidor da enzima conversora de angiotensina**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Professores Doutores: EUNICE ANDRÉ (UFPR), JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR), YANNA DANTAS RATTMANN (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela *Aprovação* da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora, outorgando-lhe o Grau de **Mestre em FARMACOLOGIA**. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, EUNICE ANDRÉ, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2016.


Prof EUNICE ANDRÉ (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


Prof JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR)


Prof YANNA DANTAS RATTMANN (UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JANIANA RAIZA JENTSCH MATIAS DE OLIVEIRA**, intitulada: **"Envolvimento do receptor TRPV1 no extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos tratados com inibidor da enzima conversora de angiotensina"**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

Aprovação

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2016.

Prof EUNICE ANDRÉ (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)

Prof JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR)

Prof YANNA DANTAS RATTMANN (UFPR)

"Quanto mais conhecimento houver inerente numa coisa, tanto maior o amor... Aquele que imagina que todos os frutos amadurecem ao mesmo tempo, como as cerejas, nada sabe a respeito das uvas."

Paracelso

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho e ser meu refúgio e amparo nos momentos necessários;

Agradeço imensamente à minha orientadora, Professora Dr. Eunice André, pela oportunidade oferecida, por seus ensinamentos, sua amizade, paciência e dedicação. Obrigada por aumentar meu interesse em Farmacologia!;

Ao Professor Dr. Juliano Ferreira, docente da UFSC, e à Professora Dr. Daniela Cabrini, docente da UFPR, pela disposição e suas valiosas contribuições ao presente estudo;

À Professora Dr. Sara Marchesan de Oliveira, docente da UFSM, por sua colaboração;

À minha amada mãe, Vilma, por seu carinho, paciência, força e incentivo para realização do meu ideal;

Ao meu noivo, Sidnei, por todo companheirismo, carinho e paciência;

Às Professoras Dr. Joice da Cunha e Dr. Maria Fernanda Werner, por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora de qualificação e por suas valiosas considerações;

Às Professoras Dr. Juliana Chichorro e Dr. Yanna Rattmann, por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora de defesa e cujas considerações contribuíram substancialmente para a melhoria desta dissertação;

Aos colegas do Departamento de Farmacologia, especialmente aos meus queridos amigos Cláudia, Dani, Éder e Luisa, pela amizade, incentivo e apoio;

À Universidade Federal do Paraná e a todos os funcionários e professores do Departamento de Farmacologia por contribuírem para minha formação;

Agradeço, enfim, a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA	1
1.2 O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.....	4
1.3 SISTEMA CALICREÍNA-CININAS: BRADICININA.....	6
1.4 TRPV1.....	11
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.1.1 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAS E MÉTODOS	19
3.1 ANIMAIS.....	19
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	19
3.2.1 Ventilação mecânica e artificial em ratos.....	19
3.2.2 Azul de Evans como marcador.....	20
3.2.3 Extravasamento plasmático induzido pelo captopril na traqueia e brônquio de ratos respirando espontaneamente ou artificialmente ventilados.....	20
3.2.4. Extravasamento plasmático induzido pela capsaicina e bradicinina na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente.....	22
3.2.5 Efeito do antagonista TRPV1 e do antagonista do receptor B ₂ no extravasamento plasmático induzido por capsaicina e bradicinina na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente.....	22

3.2.6	Efeito do antagonista TRPV1 e do antagonista do receptor B ₂ no extravasamento plasmático induzido pelo captopril na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente.....	23
3.2.7	Participação de neurônios sensoriais que expressam TRPV1 no extravasamento plasmático induzido por capsaicina e captopril na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados.....	24
3.3	DROGAS E REAGENTES.....	25
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4.	RESULTADOS.....	26
4.1	EFEITO DO CAPTOPRIL NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS RESPIRANDO ESPONTANEAMENTE E ARTIFICIALMENTE VENTILADOS.....	26
4.2	EFEITO DA CAPSAICINA E BRADICININA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS ARTIFICIALMENTE VENTILADOS.....	28
4.3	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATRAQUEAL DOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR TRPV1 E B ₂ NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA CAPSAICINA E BRADICININA NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS ARTIFICIALMENTE VENTILADOS.....	29
4.4	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRATRAQUEAL DOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR TRPV1 E B ₂ NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELO CAPTOPRIL NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS ARTIFICIALMENTE VENTILADOS.....	32
4.5	EFEITOS DA COADMINISTRAÇÃO INTRATRAQUEAL DOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE BRADICININA B ₂ E TRPV1 EM BAIXAS DOSES NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELO IECA NAS VIAS AÉREAS.....	34

4.6	EFEITOS DA DEGENERAÇÃO DE NEURÔNIOS SENSORIAIS QUE EXPRESSAM TRPV1 NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA CAPSAICINA E CAPTOPRIL NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS ARTIFICIALMENTE VENTILADOS.....	36
5.	DISCUSSÃO.....	38
6.	CONCLUSÃO.....	49
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática da ação farmacológica dos IECAS.....	2
FIGURA 2: Metabolismo da bradicinina.....	7
FIGURA 3: Subunidades do receptor TRPV1 contendo domínios que podem ser ativados, sensibilizados ou modulados por diferentes estímulos.....	13
FIGURA 4: Desenho esquemático do procedimento de ventilação artificial com ar ambiente.....	20
FIGURA 5: Representação esquemática do protocolo de extravasamento plasmático induzido pelo captopril na traqueia e brônquio de ratos respirando espontaneamente ou artificialmente ventilados.....	21
FIGURA 6: Representação esquemática do protocolo 3.2.5.....	23
FIGURA 7: Representação esquemática do protocolo 3.2.6.....	24
FIGURA 8: Representação esquemática do protocolo 3.2.7.....	25
FIGURA 9: Efeito do tratamento intravenoso com captopril no extravasamento plasmático do corante azul de Evans na traqueia e brônquio de ratos respirando espontaneamente ou artificialmente.....	27
FIGURA 10: Curva dose-resposta para o extravasamento plasmático induzido pelo tratamento intravenoso com captopril na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados.....	27
FIGURA 11: Curvas dose-resposta para o extravasamento plasmático causado pelo tratamento intratraqueal com capsaicina ou bradicinina na traqueia e brônquio de ratos sob ventilação mecânica.....	29

FIGURA 12: Efeito do pré-tratamento intratraqueal com o antagonista seletivo do receptor TRPV1 capsazepina no extravasamento plasmático induzido pela instilação intratraqueal de capsaicina na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados.....30

FIGURA 13: Efeito do pré-tratamento intratraqueal com o antagonista seletivo do receptor B₂ Hoe 140 ou com o antagonista seletivo do receptor TRPV1 capsazepina no extravasamento plasmático induzido pela instilação intratraqueal de bradicinina na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados.....31

FIGURA 14: Efeito do pré-tratamento intratraqueal com o antagonista do receptor B₂ Hoe 140 ou com o antagonista do receptor TRPV1 capsazepina no extravasamento plasmático induzido pelo tratamento agudo com captopril na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados.....33

FIGURA 15: Efeito do pré-tratamento intratraqueal com a coadministração de baixas doses dos antagonistas Hoe 140 e capsazepina no extravasamento plasmático induzido pelo tratamento agudo com captopril na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados.....35

FIGURA 16: Efeito da degeneração de neurônios sensoriais que expressam o receptor TRPV1 no extravasamento plasmático induzido pela instilação intratraqueal de capsaicina ou pelo tratamento agudo com captopril na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados.....37

FIGURA 17: Representação esquemática do mecanismo proposto pelo qual captopril pode promover sensibilização do receptor TRPV1, pelo menos em parte, via ativação do receptor B₂ nas vias aéreas de ratos mecanicamente ventilados.....49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMPC: monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA: análise de variância
ARBs: bloqueadores do receptor de angiotensina
AT₁: receptor de angiotensina subtipo 1
AT₂: receptor de angiotensina subtipo 2
ATP: adenosina trifosfato
B₁: receptor de bradicinina subtipo 1
B₂: receptor de bradicinina subtipo 2
BK: bradicinina
Ca²⁺: íons cálcio
CAMKs: proteínas quinase dependentes de Ca²⁺/calmodulina
CAP: captopril
CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX: ciclooxigenase
CPS: capsaicina
CPZ: capsazepina
DAG: diacilglicerol
DMSO: dimetilsulfóxido
DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica
ECA: enzima conversora de angiotensina
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
e.p.m.: erro padrão da média
EUA: Estados Unidos da América
FDA: Food and Drug Administration
GMPc: monofosfato cíclico de guanosina
GPCR: receptor acoplado a proteína G
GRD: gânglio da raiz dorsal
12-HPETE: 12-hidroperoxieicosatetraenóico
15-HPETE: 15-hidroperoxieicosatetraenóico
HOE: Hoe 140
IECAs: inibidores da enzima conversora de angiotensina
IP₃: inositol (1,4,5)-trifosfato
i.p.: intraperitoneal
i.t.: intratraqueal
i.v.: intravenoso

LOX: lipoxigenase
MAPKs: proteínas quinase ativadas por mitógeno
Na⁺: íons sódio
NaCl: cloreto de sódio
NADA: N-araquidonoildopamina
NO: óxido nítrico
NTS: núcleo do trato solitário
PGI₂: prostaciclina I₂
pH: potencial hidrogeniônico
PIP₂: fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato
PLA₂: fosfolipase A₂
PLCβ: fosfolipase C Beta
PLCγ: fosfolipase C Gamma
PKC: proteína quinase C
PKA: proteína quinase A
ROS: espécies reativas de oxigênio
RNS: espécies reativas de nitrogênio
RTX: resiniferatoxina
SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona
s.c.: subcutâneo
SCC: sistema calicreína-cininas
SP: substância P
TKs: taquicininas
TRP: receptor de potencial transitório
TRPA1: receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPV1: receptor de potencial transitório vanilóide 1
Vei: veículo

RESUMO

Inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs) são fármacos geralmente bem tolerados e considerados relativamente seguros, muito utilizados no tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e doença renal. Entretanto, efeitos adversos foram relatados incluindo tosse seca não produtiva e angioedema, ocasionando uma baixa adesão à terapia. O mecanismo pelo qual IECAs promovem esses efeitos adversos não está totalmente elucidado, embora o aumento dos níveis plasmáticos de bradicinina durante a terapia com IECAs pareça desempenhar um papel importante. Devido à capacidade da bradicinina em sensibilizar e aumentar a probabilidade de abertura do receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1), investigou-se o papel desse canal no extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos tratados com captopril, um IECA. Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração intravenosa (i.v.) de captopril (2,5 mg/kg) não causou extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos que respiravam espontaneamente, entretanto, induziu um significativo aumento do extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente. A instilação intratraqueal (i.t.) de capsaicina ou bradicinina (BK), também induziu um aumento no extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente. Como esperado, o extravasamento induzido pela capsaicina foi inibido pelo pré-tratamento i.t. com o antagonista seletivo TRPV1 capsazepina (CPZ, 100 nmol/100 µl). Além disso, o extravasamento plasmático causado pela BK foi inibido tanto pela CPZ quanto pelo antagonista do receptor B₂ Hoe 140 (HOE, 10 nmol/100 µl). Interessantemente, o pré-tratamento i.t. com HOE ou CPZ, isoladamente ou com sua associação em doses que *per se* não possuem efeitos inibitórios, também inibiu o extravasamento plasmático induzido pelo captopril na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente. E ainda, a neurodegeneração de neurônios sensoriais que expressam TRPV1, por meio do tratamento com uma dose elevada de capsaicina (50 mg/kg) em ratos neonatos, aboliu o extravasamento plasmático induzido tanto pela capsaicina quanto por captopril em ratos adultos sob ventilação artificial. Em conclusão, o estudo identificou que captopril é capaz de sensibilizar o receptor TRPV1, em parte, via ativação de receptor B₂ induzindo o extravasamento de plasma nas vias aéreas de ratos submetidos à ventilação mecânica. Os achados podem contribuir para elucidação do possível mecanismo pelo qual IECAs promovem efeitos adversos nas vias aéreas e proporcionar uma nova visão sobre a administração de captopril em pacientes utilizando ventilação mecânica.

Palavras-chave: Vias aéreas; captopril; bradicinina; ventilação mecânica; TRPV1.

ABSTRACT

Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) are widely used in the treatment of hypertension, congestive heart failure and renal disease, are considered relatively safe and generally well-tolerated drugs. However, adverse effects to ACEIs have been reported, including non-productive cough and angioedema, what leads to poor adherence to therapy. The mechanisms by which ACEIs promote adverse effects are not fully elucidated, although increased bradykinin plasma levels following ACEI therapy seems to play an important role. Since bradykinin by binding at B₂ receptor can sensitize the transient potential vanilloid receptor 1 (TRPV1), we investigated the role of TRPV1 in plasma extravasation in the trachea and bronchi of rats treated with captopril, an ACEI. We observed that intravenous (i.v.) administration of captopril (2.5 mg/kg) did not cause plasma extravasation in trachea and bronchi of spontaneously breathing rats, but induced plasma extravasation in trachea and bronchi of artificially ventilated rats. The intratracheal (i.t.) instillation of capsaicin or bradykinin also induced an increase on plasma extravasation in trachea and bronchi of artificially ventilated rats. As expected, capsaicin-induced plasma extravasation was inhibited by i.t. pretreatment with TRPV1 selective antagonist capsazepine (CPZ, 100 nmol/100 µl), and bradykinin-induced plasma extravasation by the i.t. pretreatment with the selective B₂ receptor antagonist Icatibant, originally known as Hoe 140 (HOE, 10 nmol/100 µl). Interestingly, bradykinin-induced plasma extravasation was also inhibited by CPZ. The pretreatment with HOE or CPZ, singly or in combination at doses which *per se* do not cause inhibitory effects, significantly inhibited the plasma extravasation induced by captopril treatment in artificially ventilated rats. In addition, the treatment with a high dose of capsaicin (50 mg/kg) in newborn rats, which induces degeneration of TRPV1-expressing sensory neurons abolished both capsaicin and captopril-induced plasma extravasation in artificially ventilated rats. In conclusion, our study identified that captopril promoted sensitization of TRPV1, via B₂ receptor activation, inducing plasma extravasation in the airways of mechanically ventilated rats. The present findings may contribute to the elucidation of a possible pathway by which ACEIs induce adverse effects on airways, and add a new view about the administration of captopril in patients using mechanical ventilation.

Keywords: Airways; captopril; bradykinin; mechanical ventilation; TRPV1.

1. INTRODUÇÃO

1.1 INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

A hipertensão é uma doença altamente prevalente. Nos Estados Unidos da América (EUA), por exemplo, um a cada três adultos são hipertensos, e os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs) estão dentre as medicações mais comuns e efetivas usadas no tratamento da hipertensão (VASEKAR & CRAIG, 2012). No ano de 2010 foram contabilizadas mais de 168 milhões de prescrições desta classe de fármacos nos EUA (BERNSTEIN et al., 2013). De fato, as diretrizes recentes (2013-2014) para o gerenciamento da hipertensão revelam que os IECAs ainda são recomendados como fármacos de primeira escolha para o tratamento da hipertensão arterial, bem como da insuficiência cardíaca, disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, pós-infarto do miocárdio, e para retardar a progressão do diabetes tipo 1 e 2 e a nefropatia não diabética (ACHARYA et al., 2003; REGOLI & GOBEIL, 2015; SATO & FUKUDA, 2015).

Esse destaque para os IECAs é justificado por serem as únicas drogas anti-hipertensivas capazes de reduzir propriamente o desequilíbrio entre o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o sistema calicreína-cininas, restaurando a homeostasia cardiovascular ótima e reduzindo significativamente a morbidade e o risco das várias causas de mortalidade nos indivíduos afetados pela hipertensão e outras doenças cardíacas (REGOLI & GOBEIL, 2015).

IECAs possuem a capacidade de se ligar competitivamente ao sítio ativo da enzima conversora de angiotensina (ECA), interferindo na habilidade da enzima em se ligar e clivar seus substratos. Assim, a eficácia terapêutica desses agentes é derivada principalmente da inibição da conversão de angiotensina I em um peptídeo vasoconstritor, a angiotensina II, bloqueando as ações do SRAA (ZAMAN, OPARIL & CALHOUN, 2002). Embora esse bloqueio seja essencial para os efeitos dos IECA, a inibição da enzima pode adicionalmente potencializar outro sistema, o calicreína-cininas, uma vez que o potente vasodilatador bradicinina, entre outras cininas, é outro importante substrato da ECA, especialmente na vasculatura pulmonar (REGOLI & GOBEIL, 2015), fornecendo efeitos vasoprotetores, anti-hipertensivos e antioxidantes adicionais (Figura 1) (SULPIZIO et al., 2004).

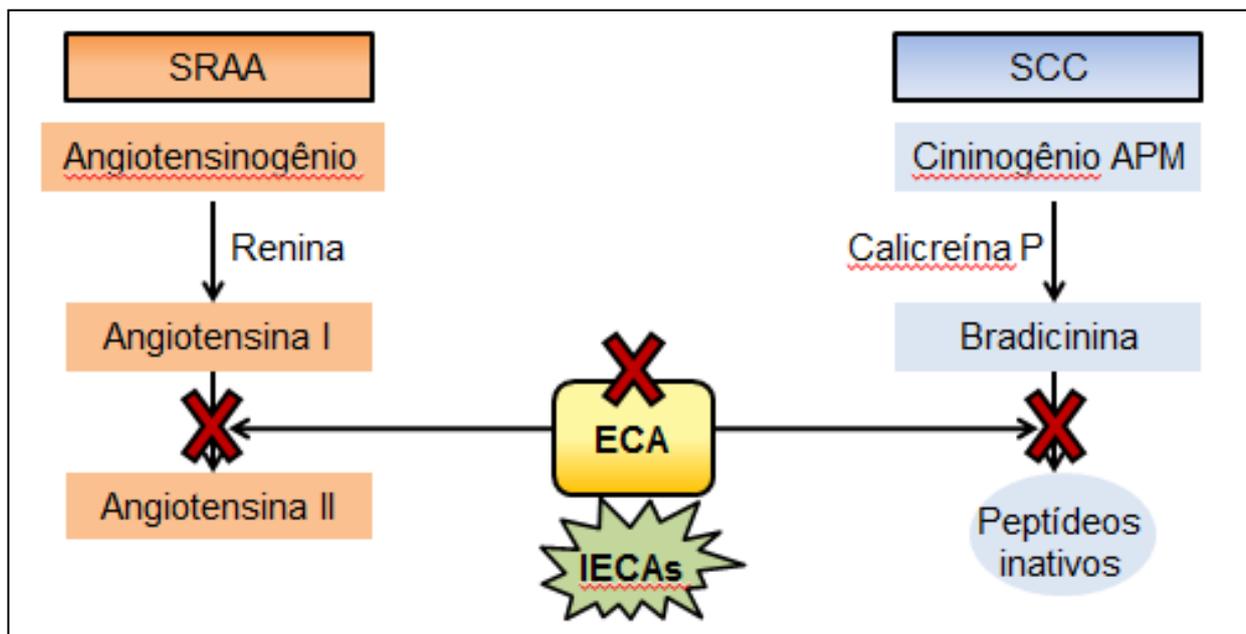


FIGURA 1: Representação esquemática da ação farmacológica dos IECAs. A inibição da ECA por ação dos IECAs reduz a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) por inibir a formação do octapeptídeo vasoconstritor angiotensina II. Adicionalmente, potencializa a atividade do sistema calicreína-cininas (SCC) por inibir o metabolismo do peptídeo vasodilatador bradicina a peptídeos inativos, promovendo efeitos adicionais.

Atualmente 10 IECAs foi aprovado pelo FDA para o tratamento da hipertensão arterial, todos disponíveis como genéricos (KAUFMAN, 2013). Estes podem ser divididos em 3 subgrupos, de acordo com o modo com que são metabolizados, como compostos ativos metabolizados a compostos ativos (captopril, por exemplo), pró-drogas que requerem metabolismo hepático para se tornar ativas (enalapril, ramipril, entre vários outros) e compostos ativos excretados inalterados (lisinopril) (ZAMAN, OPARIL & CALHOUN, 2002).

No entanto, IECAs também diferem em relação à sua biodisponibilidade, ligação às proteínas plasmáticas, lipídios, solubilidade, afinidade com o sítio de ligação da ECA, tempo de meia-vida e potência (OOI & BALL, 2007). E ainda, podem ser divididos em agentes contendo o grupamento sulfidril (captopril e zofenopril), grupo funcional dicarboxilato (enalapril, ramipril, quinapril, lisinopril, imidapril, entre outros) ou grupo funcional fosfonato (fosinopril), com base em sua estrutura molecular (CAMPO et al., 2013).

Esta classe de fármacos é geralmente bem tolerada e considerada relativamente segura. Entretanto, todos os IECAs podem causar efeitos adversos em maior ou menor grau incluindo tosse seca não produtiva (5 - 25% de incidência) e angioedema (<1%). (MORIMOTO et al., 2004; OMBONI & BORGHI, 2011).

Embora esse tipo de tosse seja mais desagradável e irritante do que incapacitante, esta tem sido uma das razões para a baixa adesão à terapia. Diferentemente, o angioedema, caracterizado por um edema localizado devido ao rápido extravasamento plasmático de vênulas pós-capilares, costuma acometer a pele e, de modo preocupante, as vias aéreas superiores, o que pode requerer hospitalização e tratamento intensivo (VASEKAR & CRAIG, 2012).

O padrão de resposta do paciente frente a esses efeitos induzidos durante o tratamento com IECAs é imprevisível, não possuindo relação com a dose ou duração da terapia. Em alguns pacientes os efeitos aparecem após o primeiro dia de administração, em outros após um período de até oito anos (HOOVER et al., 2010). No entanto, estudos demonstraram que o angioedema afeta cerca de 1 a cada 2500 pacientes durante a primeira semana de exposição (MESSERLI & NUSSBERGER, 2000). Alguns fatores de risco podem predispor a sua ocorrência como a origem étnica (prevalência é cinco vezes maior na população africano americana do que em caucasianos), ser do sexo feminino, possuir idade acima de 65 anos, ter o hábito de fumar ou ter se submetido à cirurgia das vias aéreas superiores (CAMPO et al., 2013).

Em relação ao tratamento farmacológico do angioedema, especialmente quando ocorre comprometimento das vias aéreas superiores, medicamentos como anti-histamínicos, anticolinérgicos, corticosteroides e adrenalina, apesar de pouco provável resolução, são frequentemente utilizados. A gravidade da situação pode também requerer intubação ou traqueostomia (VASEKAR & CRAIG, 2012).

Descontinuar o tratamento é o primeiro estágio para a reversão deste efeito adverso ou da tosse seca incapacitante, sendo que os sinais e sintomas geralmente se resolvem entre 24 – 48 horas após a retirada do IECA (VASEKAR & CRAIG, 2012). Adicionalmente, pesquisadores demonstraram que a administração de uma única injeção subcutânea do antagonista do receptor de bradicinina B₂, Hoe 140 (HOE; também chamado de Icatibant), em pacientes acometidos por angioedema durante o tratamento com IECAs, promoveu uma rápida e completa recuperação dos mesmos, evitando o uso de procedimentos invasivos (BAS et al., 2010).

As informações acima descritas em conjunto a outros dados da literatura, demonstram que os níveis plasmáticos de bradicinina costumam aumentar devido a inibição farmacológica da ECA durante o tratamento com IECAs (BERNSTEIN et al., 2013), assim como os níveis de cininas nos vasos, rim, pulmão, coração e tecido

adiposo de ratos (REGOLI, PLANTE & GOBEIL, 2012), sugerindo que a bradicinina possa desempenhar um papel importante nestes efeitos adversos descritos.

De fato, a bradicinina é um importante substrato da ECA e tem seu metabolismo inibido durante o tratamento com IECAs (SULPIZIO et al., 2004). No entanto, apesar dessa evidência do acúmulo de bradicinina após o tratamento com IECAs ser possivelmente a causa da tosse e angioedema, o mecanismo exato pelo qual os mesmos são desencadeados ainda não está completamente elucidado (FOX et al., 1996; TAKAHAMA et al., 1996; EMANUELI et al., 1998).

A seguir, para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos IECAs no SRAA e no sistema caliceína-cininas, ambos serão abordados abaixo.

1.2 O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

O SRAA é composto por duas enzimas, a renina e a ECA, que agem sequencialmente para produzir angiotensina II. A renina é uma protease com distribuição tecidual limitada às células justa-glomerulares renais. Sua função é promover a ativação do estágio inicial do sistema, no qual ocorre a clivagem da globulina de alto peso molecular angiotensinogênio em um decapeptídeo biologicamente inerte chamado angiotensina I, o qual é liberado para a circulação (ATLAS, 2007).

Diferentemente, a ECA é uma dipeptidilcarboxidase expressa em altas quantidades no endotélio vascular e pulmão, epitélio tubular proximal renal e epitélio intestinal ciliado. Por ser relativamente não seletiva em relação à especificidade com seus substratos, sua ação no SRAA promove a conversão do substrato angiotensina I em um octapeptídeo biologicamente ativo chamado angiotensina II, enquanto no sistema caliceína-cininas a enzima promove a inativação do substrato bradicinina (um nonapeptídeo vasodilatador) a metabólitos inativos (ATLAS, 2007; BERNSTEIN et al., 2013). Ambos os substratos citados são capazes de afetar diretamente a pressão arterial, e, portanto, a ECA possui um papel importante na manutenção da pressão arterial (REGOLI, PLANTE & GOBEIL, 2012).

A maioria das funções biológicas do SRAA são mediadas por meio da ação do octapeptídeo angiotensina II em seus receptores de angiotensina metabotrópicos do tipo 1 (AT₁) e 2 (AT₂), embora 4 subtipos de receptores já tenham sido descritos. A ativação do receptor AT₂ pode mediar vasodilatação, efeitos apoptóticos no músculo liso vascular e inibir o crescimento e a remodelação do coração (ATLAS, 2007).

Entretanto, é atuando em seu receptor AT₁, ocasionando resumidamente a ativação de fosfolipase β 1 (PLC β 1) e promovendo ao final um aumento da liberação

de íons cálcio (Ca^{2+}) de estoques intracelulares e a ativação de proteína quinase C (PKC) (BERNSTEIN et al., 2013), que angiotensina II promove efeitos como a liberação de aldosterona, ocasionando retenção de íons sódio (Na^+), e vasoconstrição, que, em conjunto, tendem a elevar a pressão arterial e causar hipertrofia de miócitos cardíacos e células vasculares musculares lisas (ZAMAN, OPARIL & CALHOUN, 2002).

Assim, o SRAA desempenha um papel importante no controle homeostático da pressão arterial, da perfusão tecidual e volume extracelular, o que foi demonstrado em estudos prévios com camundongos geneticamente modificados que, por apresentar uma mutação capaz de eliminar o angiotensinogênio, a enzima renina, a ECA, ou os receptores AT_1 , componentes do SRAA, apresentaram uma marcante redução da pressão arterial (BERNSTEIN et al., 2013).

Quando as ações promovidas por meio da ativação do receptor AT_1 e fatores de risco como a idade são combinados com estressores da vida moderna a atividade do SRAA pode aumentar. Esse aumento pode ocasionalmente estar associado a uma redução nas funções compensatórias do sistema caliceína-cininas, que em situações normais é capaz de modular e neutralizar muitas das ações do SRAA via liberação de peptídeos vasodilatadores como a bradicinina (REGOLI, PLANTE & GOBEIL, 2012; REGOLI & GOBEIL, 2015).

Uma vez instaurado esse desequilíbrio entre os dois sistemas um aumento da pressão arterial pode ser resultante, fazendo com que a ECA participe e contribua para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Desse modo, ambos os sistemas tornaram-se alvos terapêuticos interessantes para o desenvolvimento de fármacos, especialmente para aqueles com habilidade de inibir a ECA, por antagonizar o SRAA e adicionalmente potencializar o sistema caliceína-cininas, objetivando a redução e o controle da pressão arterial, bem como a prevenção de eventos cardiovasculares em pacientes com alto risco.

Assim, o desenvolvimento dos chamados fármacos IECAs capazes de agir sobre esses dois sistemas regulatórios, que possuem funções opostas, foi facilitado especialmente após a observação de que a ECA e a enzima cininase II são a mesma enzima, responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II e pela degradação da bradicinina (BERNSTEIN et al., 2013).

Não podemos deixar de citar as importantes contribuições do farmacologista brasileiro Sergio Henrique Ferreira e colaboradores na descoberta desta classe de fármacos, por isolarem em 1965 um fator do veneno de uma cobra da América do Sul, a *Bothrops jararaca*, capaz de potencializar a atividade vasodilatadora da bradicinina no íleo de cobaias e de promover hipotensão sistêmica. Essa evidência permitiu que,

por volta de 1968, peptídeos capazes de inibir a ECA fossem isolados deste fator tornando possível nos anos seguintes a geração dos IECAs, sendo o captopril o primeiro inibidor aprovado para uso humano por via oral pelo FDA (Food and Drug Administration) no início de 1980 (VANE, 1999; BERNSTEIN et al., 2013).

1.3 SISTEMA CALICREÍNA-CININAS: BRADICININA

A bradicinina foi reportada pelo Prof. Dr. Maurício Rocha e Silva e colaboradores no ano de 1949, sendo descrita como um potente agente vasodilatador liberado no plasma, utilizando para a descoberta o veneno da cobra *Bothrops jararaca* (COSTA-NETO et al., 2008).

Juntamente com outros peptídeos pró-inflamatórios (que contém uma sequência de bradicinina em sua estrutura) gerados no plasma e tecidos, ela integra o grupo chamado cininas que compõe o sistema calicreína-cininas (TRAMONTANA et al., 2001).

Esse sistema é composto por uma cascata multiproteica endógena cuja ativação promove efeitos fisiológicos e patofisiológicos, como o acionamento da via de coagulação intrínseca e a hidrólise enzimática, por ação de enzimas proteolíticas (calicreínas), de glicoproteínas circulantes precursoras (cininogênios) com consequente liberação dos peptídeos relacionados à bradicinina (cininas) (KASHUBA et al., 2013).

Em humanos, a calicreína plasmática, expressa principalmente no fígado, libera o nonapeptídeo bradicinina ($\text{Arg}^1 - \text{Pro}^2 - \text{Pro}^3 - \text{Gly}^4 - \text{Phe}^5 - \text{Ser}^6 - \text{Pro}^7 - \text{Phe}^8 - \text{Arg}^9$) por clivar o cininogênio de alto peso molecular nos resíduos arginina³⁸⁹-serina³⁹⁰, e lisina³⁸⁰-arginina³⁸¹ (MORI, SAKAMOTO & NAGASAWA, 1981; MOREAU et al., 2005).

Diferentemente, a calicreína tissular é capaz de clivar o cininogênio de alto e baixo peso molecular, hidrolisando os resíduos amino-terminais metil³⁷⁹-lisina³⁸⁰ e carboxi-terminais arginina³⁸⁹-serina³⁹⁰, formando o decapeptídeo calidina (Lys^1 -bradicinina), que pode ser convertido a bradicinina por ação da enzima aminopeptidase P (ABRAHAM, SCURI & FARMER, 2006). Entretanto, em roedores, tanto a calicreína plasmática quanto a tissular formam preferencialmente bradicinina (CAMPBELL, 2003).

A produção de cininas *in vivo* é controlada em parte por inibidores endógenos das enzimas calicreínas, sendo que os principais são o inibidor C1, a α 2-macroglobulina e a antitrombina III (CAMPBELL, 2003). Entretanto, depois de formadas, bradicinina e calidina podem ser rapidamente hidrolisadas por ação de

peptidases, razão pela qual a bradicinina apresenta uma meia-vida de apenas 15 segundos no plasma e seus níveis circulantes geralmente são baixos (MAURER et al., 2011).

A enzima cininase I, conhecida como carboxipeptidase N (no plasma) atua no terminal carboxi da molécula de bradicinina e remove o resíduo Arg⁹, produzindo um metabólito com atividade biológica, o des-Arg⁹-bradicinina. Outro tipo de cininase I, conhecida como carboxipeptidase M (na membrana celular) remove o aminoácido arginina da porção C-terminal das moléculas da bradicinina e da calidina formando des-Arg⁹-bradicinina e des-arg¹⁰-calidina, respectivamente. A enzima cininase 11-endopeptidase neutra 24.11, uma metaloprotease, inativa as cininas por remover o dipeptídeo C-terminal Phe-Arg da bradicinina, agindo ainda em outros peptídeos (CASSIM, MODY & BHOOLA, 2002; CAMPBELL, 2003).

E ainda, a ECA, enzima que converte angiotensina I em angiotensina II, também chamada de cininase II, é responsável por grande parte do metabolismo da bradicinina nos pulmões, clivando sequencialmente 2 aminoácidos do seu terminal carboxi, o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹ e Ser⁶-Pro⁷, produzindo um metabólito inativo (Figura 2) (KAPLAN, JOSEPH & SILVERBERG, 2002; CAMPBELL, 2003).

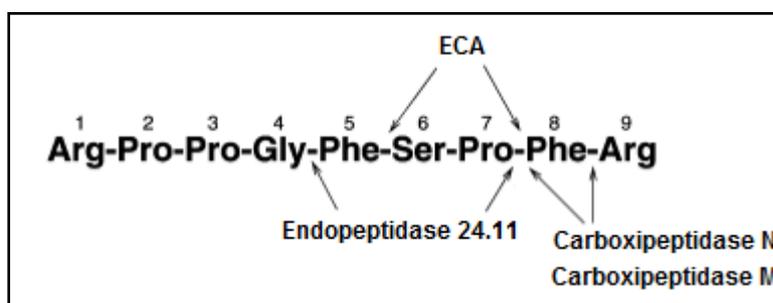


FIGURA 2: Metabolismo da bradicinina. Carboxipeptidase N é também conhecida como cininase I e a enzima conversora de angiotensina (ECA) como cininase II. Carboxipeptidases M e N produzem uma clivagem sequencial de aminoácidos do terminal carboxi da bradicinina. ECA é uma carboxidipeptidase que produz a clivagem sequencial de dipeptídeos do terminal carboxi do peptídeo bradicinina (Figura modificada) (CAMPBELL, 2003).

Assim, como citado anteriormente, os efeitos terapêuticos dos IECAs dependem largamente do aumento dos níveis de cininas e da potencialização deste sistema alcançados através da inibição da ECA, embora, logicamente, o bloqueio do SRAA também seja essencial.

O sistema calicreína-cininas se opõe aos efeitos deletérios, como hipertrofia e hiperplasia sobre as estruturas cardiovasculares, promovidos com a ativação do SRAA, uma vez que as cininas bradicinina (BK) e Lys-BK (calidina) são potentes e eficientes agentes vasodilatadores (REGOLI, PLANTE & GOBEIL, 2012; REGOLI & GOBEIL, 2015), gerando efeitos anti-hipertensivos, anti-trombogênicos, anti-proliferativos, anti-fibrogênicos, vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (MAURER et al., 2011).

Os efeitos farmacológicos das cininas podem ser mediados pela ativação dos receptores de bradicinina tipo B₁ e B₂, membros de uma superfamília de receptores acoplados a diferentes tipos de proteína G (GPCR) e que estão presentes na membrana plasmática (MOREAU et al., 2005; ABRAHAM, SCURI & FARMER, 2006).

Receptores do tipo B₁ estão presentes em baixos níveis (ou ausentes) em tecidos normais, mas podem ser rapidamente sintetizados nas vias aéreas e outros tecidos durante processos inflamatórios. Bradicinina, em altas concentrações, pode ativar o receptor, porém com menor potência quando comparada aos seus metabólitos des-Arg (des-arg⁹-bradicinina e des-arg¹⁰-bradicinina), provenientes da ação da enzima cininase I sobre a bradicinina (CALIXTO et al., 2004; RHALEB, YANG & CARRETERO, 2011).

Diferentemente, os principais efeitos fisiológicos da bradicinina em tecidos não inflamados, por exemplo, nas vias aéreas, parecem ser mediados através da ativação de receptores do subtipo B₂, que são constitutivamente expressos e estão presentes em densidade relativamente constante em várias células (ICHINOSE & BARNES, 1990; NAKAJIMA et al., 1994; ABRAHAM, SCURI & FARMER, 2006).

Receptores B₁ estão acoplados a proteínas G_q e G_i. Receptores B₂ estão acoplados a proteína G_{αq}, embora interajam com outros tipos de proteínas G incluindo G_{αi}, G_{αs} e G_{α12/13} (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

Resumidamente, a ativação do receptor B₂ acoplado a proteína G_{αq} por bradicinina promove o aumento dos níveis de segundo mensageiros, como inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), via hidrólise do fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP₂) por ação da enzima PLCβ, resultando em um aumento da liberação de íons Ca²⁺ dos estoques celulares, o que auxilia a liberação de neuropeptídeos por exocitose de neurônios sensoriais primários nociceptivos, e a ativação de isoformas específicas de PKC que podem fosforilar proteínas alvo (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; PETHO & REEH, 2012).

Adicionalmente ou alternativamente, a ativação do receptor de bradicinina acoplado a proteína G promove a ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), favorecendo a liberação de ácido araquidônico. Assim, indiretamente, a bradicinina

pode promover ações importantes, uma vez que o ácido araquidônico liberado possibilita a produção de mediadores lipídicos, os prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) e leucotrienos por ação das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) respectivamente (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; PETHO & REEH, 2012).

A existência de várias vias de transdução resultantes da ativação do receptor B₂ contribui com parte dos efeitos induzidos por bradicinina (CALIXTO et al., 2000). Nos vasos sanguíneos, por exemplo, ao se ligar em seus receptores B₂ endoteliais, bradicinina promove a estimulação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a produção de óxido nítrico (NO) através de mecanismos mediados por íons Ca²⁺ em células endoteliais, que se difunde do endotélio para músculo liso vascular onde ativa a guanilato ciclase com subsequente aumento de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (MARCEAU & REGOLI, 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MAURER et al., 2011; REGOLI & GOBEIL, 2015).

E ainda, contribui para a formação de outro mediador secundário, a prostaciclina I₂ (PGI₂), capaz de inibir a agregação plaquetária e promover a vasodilatação através da produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) em células do músculo liso, ocasionando uma elevação de íons Ca²⁺ intracelular e a formação do fator hiperpolarizante. Assim, bradicinina promove um efeito vasodilatador e um aumento da permeabilidade vascular, causando hipotensão devido à diminuição da resistência periférica, contribuindo com efeitos anti-hipertensivos e cardioprotetores em indivíduos que fazem uso de IECAs (MARCEAU & REGOLI, 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MAURER et al., 2011; REGOLI & GOBEIL, 2015).

No entanto, além dos efeitos benéficos acima descritos, as cininas são notoriamente agentes pró-inflamatórios, capazes de estimular a migração de células do sangue (leucócitos), monócitos do sangue para os tecidos, e de promover a síntese de prostaglandinas e de citocinas em diversos leucócitos. Adicionalmente, em terminais nervosos periféricos, receptores de cininas ativam nervos sensoriais causando dor. Além disso, as cininas podem acentuar reações defensivas nas vias respiratórias, no trato gastrointestinal, na vesícula biliar ou na bexiga urinária e de outras vísceras (REGOLI, PLANTE & GOBEIL, 2012).

No trato respiratório, as ações da bradicinina parecem ser resultantes de interações complexas, entre o receptor B₂ e mecanismos moleculares adicionais. Receptores B₂ são expressos constitutivamente nos sítios brônquicos e vasos pulmonares, células epiteliais, músculo liso das vias aéreas, glândulas submucosa e nervos (MAURER et al., 2011). No entanto, existem evidências de que possivelmente

ambos os receptores de bradicinina B₁ e B₂ estejam expressos nas vias aéreas murinas e no brônquio de ratos (LEI et al., 2010).

Entretanto, o receptor B₂ parece ser o principal receptor envolvido nas respostas promovidas por cininas nas vias aéreas (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). De fato, vários estudos demonstraram que, nas vias aéreas murinas, a bradicinina causa extravasamento de plasma, broncoconstrição e hiper-reatividade brônquica, e que em humanos, promove broncoconstrição (em pacientes asmáticos) e sintomas de rinite quando instilada dentro do nariz, via ativação do receptor B₂, uma vez que o tratamento com o potente e seletivo antagonista HOE, que se liga com alta afinidade ao receptor, foi capaz de inibir significativamente esses efeitos (TRAMONTANA et al., 2001; GAMA LANDGRAF et al., 2004; SULPIZIO et al., 2004; VALENTI et al., 2005).

Contudo, de maneira interessante, a broncoconstrição induzida por bradicinina parece também envolver indiretamente a liberação de produtos da ação da enzima COX, uma vez que este efeito foi inibido pela administração do inibidor não seletivo da COX indometacina e também foi alcançada com um inibidor da enzima tromboxano sintetase (ARAKAWA et al., 1992; ABRAHAM, SCURI & FARMER, 2006).

Em conjunto, essas evidências sugerem não só um envolvimento direto da ativação do receptor B₂ nas ações promovidas por bradicinina nas vias aéreas, mas também a participação de um mecanismo indireto, o qual parece envolver a liberação de metabólitos do ácido araquidônico. Entretanto, a atropina, um antagonista muscarínico, também se mostrou capaz de reduzir a broncoconstrição induzida por bradicinina (FULLER et al., 1987), sugerindo que a ativação de nervos colinérgicos também estaria envolvida nas ações deste nonapeptídeo.

Além desses mecanismos, a participação de fibras C no efeito broncoconstritor induzido por bradicinina foi evidenciada em pacientes asmáticos através da administração de um antagonista não seletivo do receptor de taquicinas (FK224) (ICHINOSE et al., 1992).

O mesmo foi demonstrado por outro estudo no extravasamento plasmático induzido por bradicinina, que também pareceu envolver a liberação de neuropeptídios de terminais nervosos sensoriais capazes de sensibilizar as fibras C, uma vez que o tratamento com um antagonista do receptor NK1 inibiu esse efeito (EMANUELI et al., 1998). Logo, a estimulação de terminações nervosas sensoriais também parece estar envolvida nas ações promovidas por bradicinina nas vias aéreas.

Tomadas em conjunto, essas evidências demonstram que bradicinina pode provocar múltiplos efeitos patofisiológicos relevantes, que inclusive são frequentemente associados com a patofisiologia de doenças respiratórias como asma e rinite (FULLER et al., 1987), e que poderiam contribuir para a hiper-reatividade e

exacerbação dos efeitos adversos que acometem pacientes em tratamento com IECAs.

De fato, Katsumata et al. (1991) demonstrou em seus estudos uma relação entre a inibição da ECA e o aumento acentuado de tosse induzida pela inalação de bradicinina em pacientes em tratamento com IECA.

Além disso, outro estudo em camundongos demonstrou uma possível associação entre as ações da bradicinina e o extravasamento plasmático induzido pelo tratamento com captopril, uma vez que este efeito foi inibido com sucesso tanto através do bloqueio seletivo do receptor B₂ quanto através da deleção genética do mesmo receptor (EMANUELI et al., 1998).

Curiosamente, outros autores relataram que a bradicinina foi capaz de sensibilizar fibras C promovendo um aumento na tosse provocada com captopril (FOX et al., 1996). A propósito, estudos demonstraram que a bradicinina, por meio de sua ligação direta em seus próprios receptores, pode indiretamente, via segundos mensageiros, sensibilizar e modificar a atividade de outros receptores, como por exemplo, aumentar a probabilidade de abertura de um canal amplamente expresso em fibras C de aferentes vagais pulmonares, o receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1 (TRPV1) (PETHO & REEH, 2012).

De fato, receptores B₂ são coexpressos com receptores TRPV1 em fibras aferentes primárias peptidérgicas (VELDHUIS et al., 2015). Dessa forma, avaliar se o TRPV1 está envolvido no mecanismo pelo qual o tratamento com IECA causa efeitos adversos, provavelmente devido ao acúmulo de bradicinina nos tecidos e plasma, via ativação direta do receptor B₂, é algo interessante a ser elucidado.

1.4 TRPV1

Receptores de potencial transitório (TRP) são canais de cátions não seletivos, com uma alta permeabilidade ao Ca²⁺ (CATERINA et al., 1997), localizados na membrana plasmática e que possuem diferentes papéis fisiológicos na sensação térmica, mecânica e química (FERNANDES, FERNANDES & KEEBLE, 2012). Por esse motivo, são capazes de modular funções celulares, e adicionalmente, atuar como integradores moleculares para vários estímulos nocivos (MORAN et al., 2011).

Canais TRP funcionais são formados por 4 subunidades tetraméricas sendo que a maior parte são homotetrâmeros, embora existam relatos na literatura sugerindo também a formação heterotetramérica de canais TRP (MICKLE, SHEPHERD, & MOHAPATRA, 2015).

Cada subunidade do canal contém seis domínios transmembrana, com um poro formado entre os domínios cinco e seis, e terminais intracelulares carboxi (C-) e amino (N-), que contém repetições de anquirina que medeiam interações proteína-proteína (JULIUS, 2013).

O primeiro TRP foi descoberto no ano de 1969, presente em uma mosca (*Drosophila melanogaster*) na qual isolaram um fotorreceptor transportando mutações no gene TRP que exibiu uma resposta transitória após a exposição à luz (O'NEILL et al., 2012). Desde então, 28 isoformas mamíferas foram identificadas e classificadas em seis diferentes subfamílias, a família TRP canônica (TRPC), TRP melastatina (TRPM), TRP vanilóide (TRPV), TRP anquirina (TRPA), TRP policistina (TRPP) e TRP mucopolina (TRPML) (NILIUS & SZALLASI, 2014).

Receptores TRPV são divididos em 6 membros (TRPV1 a TRPV6). TRPV1 foi clonado no ano de 1997 a partir de culturas de neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal de ratos e camundongos, e foi o primeiro membro da família de receptores vanilóides a ser caracterizado (CATERINA et al., 1997).

O receptor pode ser ativado diretamente pela capsaicina, princípio ativo presente nas espécies do gênero *Capsicum*, responsável pelo sabor picante da pimenta (MEOTTI, LEMOS DE ANDRADE & CALIXTO, 2014). Outros compostos pungentes isolados de plantas também podem ativar o canal incluindo a resiniferatoxina (RTX, princípio ativo da *Euphorbia resinífera*), a piperina (isolado da *Piper nigrum* ou *Piper longum*), o eugenol (isolado da *Eugenia caryophyllata*), a cânfora (isolado da *Cinnamomum camphora*), entre vários outros (para uma revisão ver MEOTTI, LEMOS DE ANDRADE & CALIXTO, 2014).

Além dos compostos presentes em plantas, estímulos físicos e químicos são capazes de ativar o TRPV1 incluindo pH baixo (<6,5) e temperatura nociva acima de 43°C. E ainda, agentes endógenos que fazem parte de uma lista crescente também sensibilizam e/ou ativam o receptor, podendo agir em conjunto para reduzir seu limiar de ativação, tais como a bradicinina, fator de crescimento do nervo, anandamida, metabólitos do ácido araquidônico como a N-araquidonoildopamina (NADA) e N-oleoildopamina, produtos da ação da enzima LOX como o 12-hidroperoxieicosatetraenóico (12-HPETE) e o 15-HPETE, leucotrieno B₄, prostaglandinas, adenosina e ATP, procinetinas, poliaminas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (JIA & LEE, 2007; PINGLE, MATTA & AHERN, 2007; SZALLASI et al., 2007).

Além dessas moléculas citadas acima, etanol, certos venenos e toxinas de aranhas, medusa e cobras também se mostraram capazes de ativar diretamente o receptor causando dor (TREVISANI et al., 2004; NILIUS & SZALLASI, 2014). Assim,

por ser ativado por uma gama de estímulos, TRPV1 é frequentemente referido como um sensor polimodal (Figura 3).

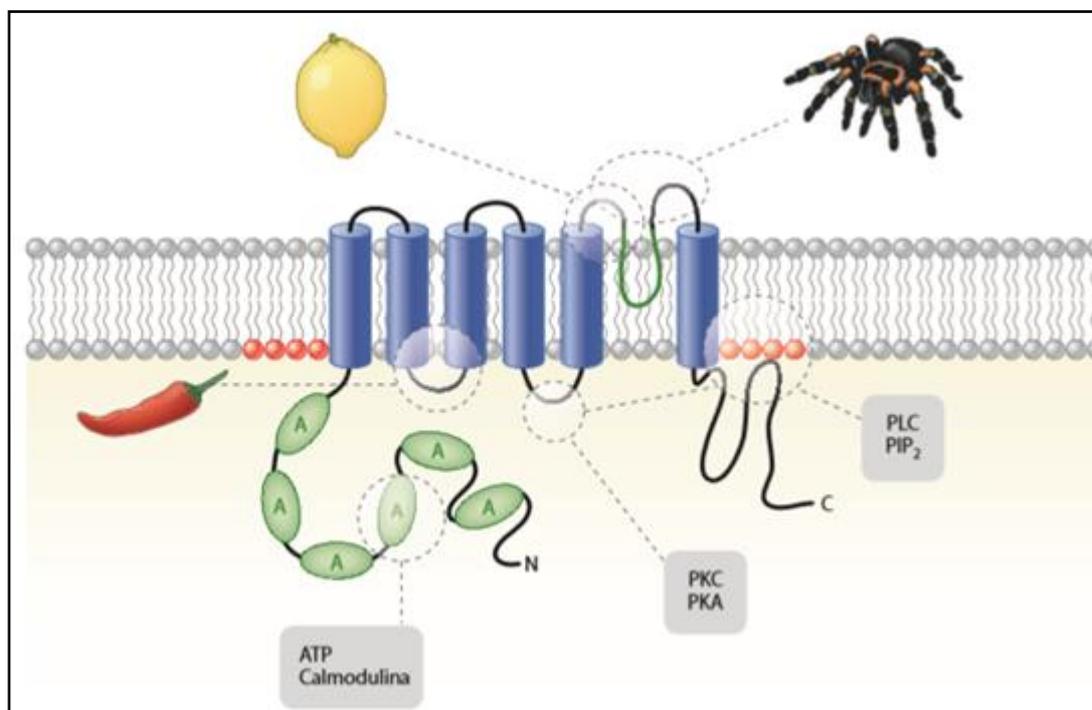


FIGURA 3: Subunidades do receptor TRPV1 contendo domínios que podem ser ativados, sensibilizados ou modulados por diferentes estímulos. Estes incluem locais de ação para capsaicina (pimenta) e ligantes vanilóides relacionados, prótons extracelulares (representados pelo limão), ou toxinas peptídicas de tarântula (aranha), bem como regiões implicadas na modulação do canal por proteínas celulares e segundos mensageiros citoplasmáticos (Figura modificada) (JULIUS, 2013).

Devido a sua natureza lipofílica, capsaicina, RTX e a maioria dos endovanilóides e endocanabinóides citados anteriormente atravessam a membrana celular facilmente, alcançando sítios de ligação no domínio citosólico do receptor e o ativando do lado intracelular (VYKLIČKÝ et al., 2008; MICKLE, SHEPHERD, & MOHAPATRA, 2015).

Todavia, uma variedade de mediadores pró-inflamatórios citados (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, ATP, produtos do metabolismo lipídico, ROS, RNS, neuropeptídeos, entre outros) que são frequentemente liberados durante condições patológicas ou inflamatórias, modulam a atividade do TRPV1 indiretamente. Estes atuam através da ativação inicial de seus próprios receptores expressos na membrana plasmática de neurônios sensoriais e que pertencem principalmente ao

grupo de GPCRs e receptores do tipo tirosina quinase para fatores de crescimento, que conduzem a uma variedade de vias de sinalização intracelulares resultando na ativação de proteínas quinases A (PKA), PKC, proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs), proteínas quinase dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKs), PLC β , PLC γ entre várias outras (para revisão ver JIA & LEE, 2007; MICKLE, SHEPHERD, & MOHAPATRA, 2015).

Adicionalmente, tem sido sugerido que o PIP₂ endógeno liga-se diretamente a uma região do domínio C-terminal TRPV1 exercendo uma inibição constitutiva sobre o canal. Entretanto, estudos apontam que essa inibição pode ser removida com a ativação da via PLC, um mecanismo que parece ter um papel essencial na sensibilização do canal induzida por bradicinina (HUANG, ZHANG & MCNAUGHTON, 2006; ROHACS, THYAGARAJAN & LUKACS, 2008).

Receptores TRPV1 possuem uma distribuição tecidual diversificada e são expressos em terminais centrais e periféricos de fibras sensoriais de pequeno e médio diâmetro, sendo a maioria fibras C e A δ . Esses receptores são expressos em células neuronais do gânglio da raiz dorsal, trigeminal, nodoso e vagal e também em células não neuronais (células endoteliais, epiteliais uroteliais, queratinócitos, dentre outras) (GEPETTI, MATERAZZI & NICOLETTI, 2006).

Por atuar como integrador molecular para vários estímulos nocivos, seu envolvimento em várias patologias vem sendo bastante estudado nos últimos anos. De fato, TRPV1 parece ser um alvo relevante em várias condições patológicas como na hiperreflexia da bexiga, na dor de origem inflamatória e neuropática, bem como em patologias que acometem o trato gastrointestinal, o trato respiratório, o sistema nervoso central, o sistema cardiovascular, além de estar envolvido em alguns casos de dermatite de contato alérgica (MORAN et al., 2011; BISHNOI et al., 2015).

Estudos demonstram que esses receptores são altamente expressos nessas condições patológicas e seu bloqueio ou ativação persistente do canal (que promove dessensibilização) parece contribuir para a melhora desses quadros (para revisão ver NILIUS et al., 2007).

Nas vias respiratórias dos mamíferos, a expressão do TRPV1 é predominantemente localizada em subtipos de nervos aferentes sensoriais vagais, apesar de sua presença em outros tipo de células, como do músculo liso pulmonar, epiteliais da traqueia e brônquios, epiteliais da laringe humana, endoteliais vasculares, da glândula submucosa, bem como células dendríticas do pulmão, também ter sido relatada (ROGERIO, ANDRADE & CALIXTO, 2011; RADRESA, BROWN & LAIRD, 2012).

Estudos morfológicos revelaram que cerca de 75% das fibras aferentes vagais que inervam as vias aéreas e pulmões são do tipo C não mielinizadas de pequeno diâmetro. Empregando técnicas de imunofluorescência e microscopia confocal em cobaias, pesquisadores reportaram que a maioria dessas fibras tipo C possui como característica distinta a coexpressão funcional do receptor TRPV1 com certos neuropeptídios em seus terminais sensoriais. Desse modo, a expressão do receptor TRPV1 confere a essas fibras a capacidade de se ativar quando desafiadas com capsaicina (LEE & GU, 2009; JIA & LEE, 2007; HO et al., 2001).

Fibras C peptidérgicas que expressam TRPV1 inervam a mucosa e submucosa do nariz, faringe, laringe, traqueia, brônquio e ao longo dos pulmões com seus corpos celulares residindo nos gânglios nodoso e jugular do nervo vago intracraniano, e no gânglio da raiz dorsal torácica (GRD) e se projetam para o núcleo do trato solitário (NTS) no tronco cerebral (CANNING & SPINA, 2009; GRACE et al., 2013).

Em cobaias essas fibras estão localizadas dentro do epitélio da traqueia, por volta do músculo liso e vasos sanguíneos, dentro das vias aéreas baixas, na vizinhança do brônquio e bronquíolos, e em volta do tecido alveolar (WATANABE et al., 2005).

Alternativamente às fibras C e em condições normais a expressão do TRPV1 nas vias aéreas foi também descrita em um pequeno número de fibras aferentes vagais de outro subtipo, porém não colocalizada com neuropeptídios em seus terminais nervosos (WATANABE et al., 2006; WATANABE et al., 2008). Estas parecem corresponder às fibras A δ intrapulmonares que terminam na mucosa traqueal, conforme observado em um estudo *in vitro* demonstrando sua capacidade de ativação após o desafio com capsaicina (HO et al., 2001).

Adicionalmente, outro estudo sugeriu que o fenótipo de fibras subtipo A δ que não expressam TRPV1 em condições normais pode ser alterado durante a inflamação alérgica das vias respiratórias, fazendo com que a fibra expresse transientemente TRPV1, bem como neuropeptídios (GEPPETTI, MATERAZZI & NICOLETTI, 2006; GRACE et al., 2013).

Resumidamente, tanto em outros tecidos quanto nas vias aéreas, a ativação do receptor TRPV1 expresso nessas terminações nervosas por seus agonistas ou ativadores endógenos promove a abertura do canal, permitindo o influxo de íons Na⁺ e Ca²⁺ através de seu poro central, com uma alta permeabilidade ao Ca²⁺. Esse rápido influxo de Na⁺ e Ca²⁺ através do receptor resulta em despolarização do potencial de membrana plasmática neuronal, o que pode promover a abertura de canais de Ca²⁺ e Na⁺ dependentes de voltagem e disparar potenciais de ação (JIA & LEE, 2007; VYKLIČKÝ et al., 2008).

Em fibras sensoriais nervosas peptidérgicas, a ativação do receptor e a geração destes potenciais de ação induz a liberação de neuropeptídeos sensoriais. Sendo assim, a ativação do receptor nas vias aéreas contribui não somente com respostas reflexas centrais, como tosse, broncoconstrição, secreção de muco, bradicardia e hipotensão (mediadas através das vias eferentes do sistema nervoso autônomo), mas também promove respostas reflexas axonais locais decorrentes da liberação de neuropeptídeos de terminais nervosos periféricos e central (JIA & LEE, 2007; VYKLIČKÝ et al., 2008).

Quando liberados, neuropeptídeos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e as taquicininas (TKs) (substância P, neurocinina A e neurocinina B) ativam seus receptores metabotrópicos CGRP e de TKs (NK₁, NK₂ ou NK₃), respectivamente, expressos em células efetoras, causando broncoconstrição, extravasamento de proteínas, edema e quimiotaxia de células inflamatórias. Estas respostas inflamatórias locais são coletivamente referidas como inflamação neurogênica (GEPPETTI, MATERAZZI & NICOLETTI, 2006; JIA & LEE, 2007; LEE & GU, 2009).

Ainda em relação ao papel do receptor TRPV1, inúmeros estudos foram realizados nos últimos anos e sua participação nas vias aéreas tem sido amplamente demonstrada e discutida. Evidências apontam o receptor TRPV1 como um mediador importante na patogênese de doenças das vias aéreas, como na asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e tosse (JIA & LEE, 2007; GRACE et al., 2014).

A administração do agonista TRPV1 capsaicina tem sido empregada como um estímulo irritativo eficaz de nervos sensoriais das vias aéreas em modelos humanos e animais (FOX et al., 1996) para avaliar hipersensibilidade das vias respiratórias a tosse e a broncoconstrição em várias doenças respiratórias, incluindo as citadas anteriormente (para uma revisão ver GRACE et al., 2014). De fato, quando aplicada na mucosa respiratória humana, capsaicina pode desencadear reflexos de tosse, broncoconstrição, espirros e secreção de muco (MORAN et al., 2011; KALINER et al., 1994).

Em adição, pacientes com asma e DPOC frequentemente apresentam a liberação de mediadores químicos de células inflamatórias nos pulmões (como bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, proteínas catiônicas derivadas dos grânulos de eosinófilos, citocinas, proteases, entre outras), que podem sensibilizar e reduzir o limiar de ativação do receptor TRPV1 (VELDHUIS et al., 2015; JIA & LEE, 2007).

Somando-se a isto, pesquisadores demonstraram que pacientes com tosse crônica apresentaram uma maior expressão de TRPV1 em nervos epiteliais das vias aéreas e uma maior sensibilidade à tosse por capsaicina (GRONEBERG et al., 2004),

bem como um aumento desse receptor no tecido não neuronal (musculatura lisa brônquica) (MITCHELL et al., 2005), um fenômeno também observado de maneira acentuada no epitélio brônquico de indivíduos asmáticos e na mucosa nasal de pacientes com rinite vasomotora (NILIUS & SZALLASI, 2014).

Em um modelo animal, cobaias submetidas à inflamação alérgica apresentaram um aumento da expressão de TRPV1 em nervos aferentes sensoriais que innervavam as vias respiratórias (WATANABE et al., 2008).

Portanto, tomados em conjunto, estes dados promovem forte evidência de que a expressão deste canal pode ser regulada sob condições patológicas e que o aumento de sua atividade pode ser a base da hipersensibilidade promovida na vigência dessas condições (O'NEILL et al., 2012).

Embora o envolvimento do receptor TRPV1 nos efeitos adversos observados nas vias aéreas após o tratamento com IECA não tenha sido estudado, alguns estudos demonstraram que o tratamento agudo ou crônico com IECAs, por exemplo, enalapril ou captopril, aumentou a tosse induzida por capsaicina em cobaias. Este efeito foi diminuído através do bloqueio do receptor NK1 ou do receptor B₂, indicando um envolvimento de substância P (SP) e de bradicinina nesse processo (TAKAHAMA et al., 1996).

Sabe-se que a inibição da ECA diminui o metabolismo de bradicinina, e dados da literatura tem demonstrado uma relação entre TRPV1 e bradicinina. Kollarik & Undem (2004), por exemplo, empregando camundongos com deleção para TRPV1, mostraram que o receptor não é obrigatório para ativação de fibras C broncopulmonares vagais induzida por bradicinina, mas que este canal pode ter um papel modulatório sobre este efeito.

Além disso, vários estudos demonstraram que a bradicinina através da estimulação de seu receptor B₂, via ativação da PKC, fosforila o canal e aumenta a probabilidade de sua abertura (PREMKUMAR & AHERN, 2000). Ferreira, Da Silva & Calixto (2004) demonstraram que a ação nociceptiva causada pela bradicinina pode ser mediada não só por uma ativação direta dos neurônios sensoriais, mas também indiretamente, por meio da liberação de mediadores lipídicos que ativam e sensibilizam TRPV1.

Adicionalmente, Grace et al. (2012) sugeriram que canais TRPV1 podem agir como efetores comuns da resposta tussígena induzida por bradicinina. Estes autores demonstraram que o antagonista seletivo do receptor capsazepina (CPZ) inibiu o influxo de íons Ca²⁺ em neurônios sensoriais vagais de gânglios isolados de cobaias, e que o antagonismo do mesmo receptor inibiu a tosse induzida por bradicinina em um modelo de tosse com essa mesma espécie (GRACE et al., 2012).

No entanto, de que maneira os IECA poderiam promover suas ações nas vias aéreas, via ativação do receptor TRPV1, ainda é uma questão a ser esclarecida. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar se o receptor TRPV1 poderia estar envolvido no extravasamento plasmático, uma característica do angioedema, induzido nas vias aéreas de ratos tratados de maneira aguda com IECA e submetidos à ventilação mecânica.

A compreensão do mecanismo de ação pelo qual o tratamento com IECAs promovem efeitos adversos nas vias aéreas de ratos poderia ser extremamente relevante para a terapia envolvendo esta classe de fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento dos receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 no extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos tratados de maneira aguda com captopril.

2.1.1 Objetivos específicos

- Verificar se o tratamento agudo com captopril causa extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos respirando espontaneamente ou mecanicamente e se o pré-tratamento com antagonistas do receptor B₂ e TRPV1 promove a redução dessa resposta.

- Verificar se os agonistas do receptor B₂ e TRPV1 causam extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos mecanicamente ventilados e se o pré-tratamento com antagonistas dos respectivos receptores promove redução dessa resposta.

- Analisar a participação de fibras sensíveis a capsaicina no extravasamento plasmático induzido pelo tratamento com capsaicina e captopril.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, pesando entre 200-250g, mantidos a uma temperatura de 21 ± 2 °C sob um ciclo claro/escuro de 12 h, com comida e água *ad libitum* (máximo de quatro ratos alojados em grupo). Os procedimentos experimentais foram realizados após a aprovação dos protocolos pelo comitê de ética local de Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (Protocolo n ° 800). Em todos os protocolos os animais foram previamente anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Um número mínimo de animais (8 a 10) foi empregado para a obtenção de dados consistentes.

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.2.1 Ventilação mecânica e artificial em ratos

A ventilação mecânica em animais anestesiados foi realizada por meio de um procedimento cirúrgico em que uma cânula foi inserida na porção cervical da traqueia, fixada com um fio de sutura e conectada a um ventilador mecânico (Ugo Basile Rodent Ventilator 7025; 50 movimentos/min; 10 ml kg^{-1} ; Ugo Basile, Comerio-Varese, Itália) para respiração artificial dos animais com ar ambiente (Figura 4) (THOMAS & WANSTALL, 2003; VALENTI et al., 2005). Em outra série de experimentos, ratos anestesiados respirando espontaneamente também foram avaliados.

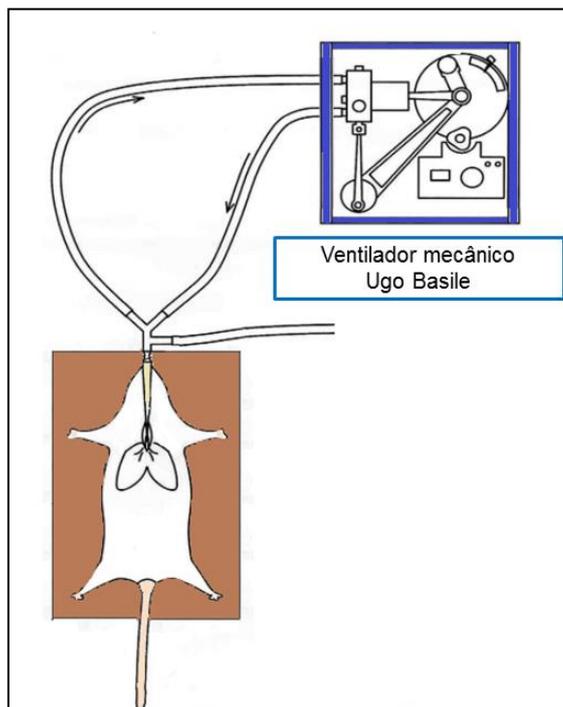


FIGURA 4: Desenho esquemático do procedimento de ventilação artificial com ar ambiente. Uma cânula é inserida na traqueia, suturada e conectada ao ventilador mecânico (Ugo Basile Rodent Ventilator) de modo a ventilar o animal mecanicamente (artificialmente) com ar em temperatura ambiente (figura modificada) (UGO BASILE).

3.2.2 Azul de Evans como marcador

Em nosso modelo a injeção do corante azul de Evans (30 mg/kg) foi administrada por via intravenosa (i.v.) na veia peniana e utilizada como marcador de extravasamento plasmático. Este corante quando injetado por via i.v. se liga a proteínas plasmáticas e permanece na vasculatura. Entretanto, na ocorrência de extravasamento plasmático ele extravasa para os tecidos, possibilitando a detecção e quantificação deste efeito.

3.2.3 Extravasamento plasmático induzido pelo captopril na traqueia e brônquio de ratos respirando espontaneamente ou artificialmente ventilados

Para avaliação do efeito do IECA no extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos, captopril (1, 2,5 ou 5 mg/kg) (EMANUELI, et al., 1998) ou seu respectivo veículo foram administrados por via intravenosa (i.v.) na veia peniana de

ratos anestesiados e submetidos à ventilação mecânica, um minuto após a injeção i.v. do corante azul de Evans (30 mg/kg).

A dose de 2,5 mg/kg, dose que causou extravasamento plasmático em animais mecanicamente ventilados, foi também avaliada em ratos que respiravam espontaneamente.

Dez minutos após a administração de captopril (BALUK et al., 1999), o tórax dos animais foi aberto e uma cânula foi inserida no ventrículo esquerdo até a aorta para realização da perfusão transcardíaca com cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. O átrio direito foi seccionado para promover a expulsão do meio de perfusão.

A traqueia e o brônquio foram removidos, limpos de seus tecidos conectivos, lavados, pesados e incubados em 1ml de formamida, mantidos por aproximadamente 24 horas em temperatura ambiente e no escuro (TREVISANI et al., 2004).

Em animais mecanicamente ventilados a traqueia foi seccionada abaixo do local de inserção da cânula para evitar o extravasamento plasmático induzido pelo procedimento cirúrgico.

A quantidade de corante extraída foi mensurada em espectrofotômetro (620 nm), interpolada em uma curva de diluição padrão (0,1 – 30 µg/ml de azul de Evans em formamida) e expressa em micrograma de corante por grama de tecido pesado (µg/g) (CZIKORA et al., 2013). O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 5).

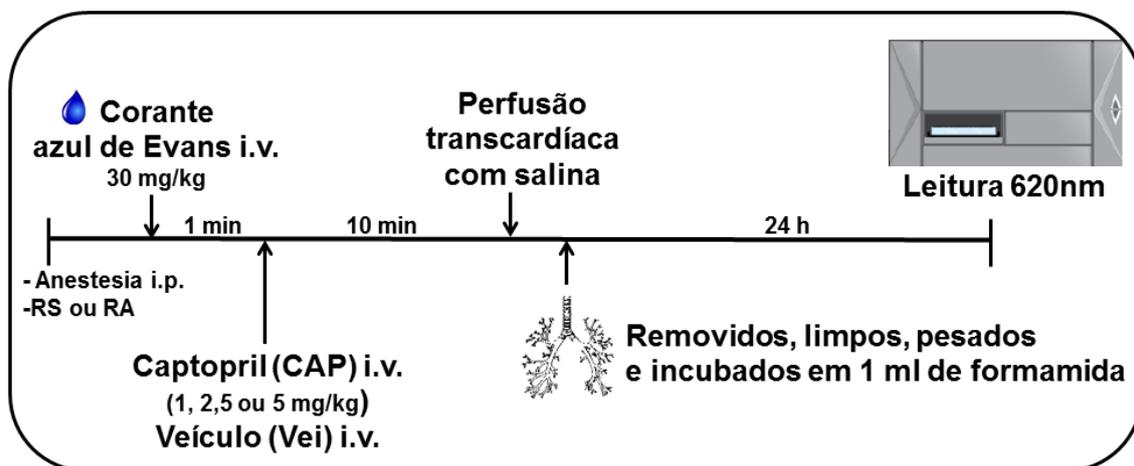


FIGURA 5: Representação esquemática do protocolo de extravasamento plasmático induzido pelo captopril na traqueia e brônquio de ratos respirando espontaneamente ou artificialmente ventilados. i.p., intraperitoneal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados; RS, ratos respirando espontaneamente.

3.2.4 Extravasamento plasmático induzido pela capsaicina e bradicinina na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente

Para avaliar seus efeitos no extravasamento plasmático, capsaicina (1, 2,5 e 5 nmol/100 µl) (LUNDBERG & SARIA,1983), bradicinina (1, 10, 30 nmol/100 µl) (LUNDBERG & SARIA,1983; ARAKAWA et al., 1992) ou seus respectivos veículos foram administrados por via intratraqueal (i.t.), um minuto após a administração i.v. do corante azul de Evans. Após 15 minutos (ANDRÉ et al., 2008) foi realizada a perfusão transcardíaca para remoção da traqueia e brônquio e a quantidade de corante extraída foi mensurada no dia seguinte conforme o procedimento descrito acima

3.2.5 Efeito do antagonista TRPV1 e do antagonista do receptor B₂ no extravasamento plasmático induzido por capsaicina e bradicinina na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente

Em outra série de experimentos, ratos anestesiados e mecanicamente ventilados foram pré-tratados com o antagonista HOE (10 nmol/100 µl) (VALENTI et al., 2005), CPZ (100 nmol/100 µl) (GEPETTI et al., 1993; TREVISANI et al., 2005) ou seus respectivos veículos 15 minutos antes da administração i.v. do corante azul de Evans (ANDRÉ et al., 2008).

Um minuto após a administração do azul de Evans, em doses selecionadas com base no experimento anterior, capsaicina (1 nmol/100 µl, i.t.), bradicinina (10 nmol/100 µl, i.t.) ou seus respectivos veículos foram administrados e após 15 minutos (ANDRÉ et al., 2008) foi realizada a perfusão transcardíaca e a remoção da traqueia e brônquio para que a quantidade de corante extraída fosse mensurada no dia seguinte como descrito anteriormente O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 6).

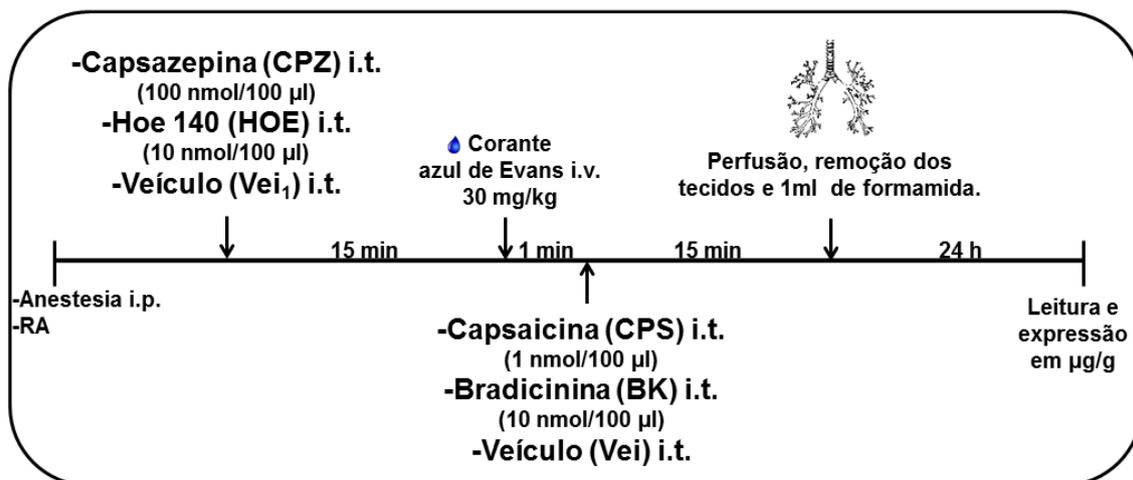


FIGURA 6: Representação esquemática do protocolo 3.2.5. i.p., intraperitoneal; i.t., intratraqueal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados.

3.2.6 Efeito do antagonista TRPV1 e do antagonista do receptor B₂ no extravasamento plasmático induzido pelo captopril na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente

Com a finalidade de avaliar o papel dos receptores TRPV1 e B₂ no extravasamento plasmático induzido pelo captopril, ratos ventilados artificialmente foram pré-tratados intratraquealmente com o antagonista seletivo TRPV1 CPZ (100 nmol/100 µl) (GEPETTI et al., 1993; TREVISANI et al., 2005), com o antagonista seletivo do receptor B₂ HOE (10 nmol/100 µl) (VALENTI et al., 2005), com a coadministração de HOE (1 nmol/ 50 µl) mais CPZ (3 nmol/50 µl) (doses que *per se* não causam inibição do extravasamento plasmático) ou com seus respectivos veículos, 15 minutos antes da administração i.v. do corante azul de Evans.

Um minuto após, captopril i.v. (2,5 mg/kg) foi administrado (EMANUELI et al., 1998). Dez minutos após o tratamento foi realizada a perfusão transcárdica (BALUK et al., 1999), permitindo a remoção da traqueia e brônquio para mensurar a quantidade do corante azul de Evans extraída após 24 horas, conforme procedimento previamente descrito. O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 7).

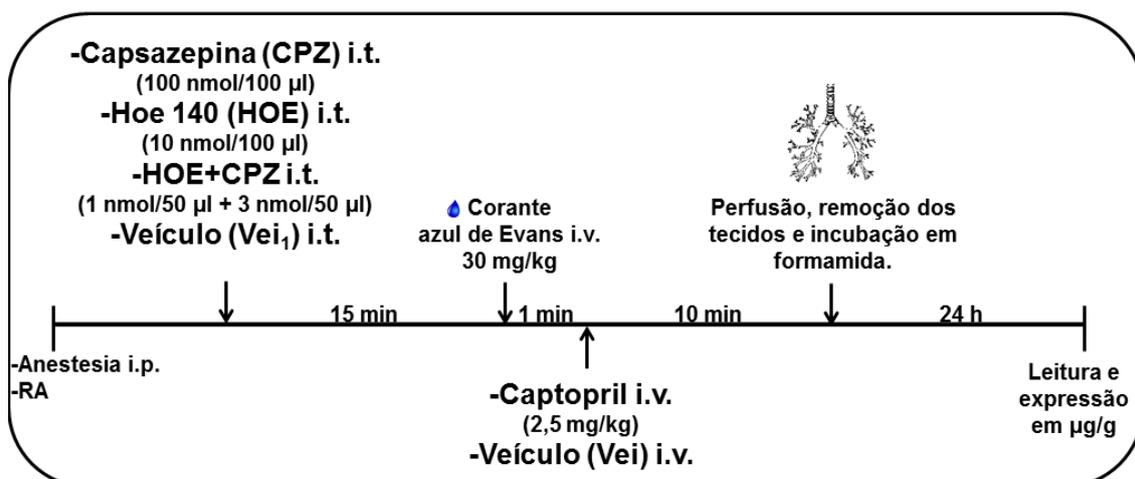


FIGURA 7: Representação esquemática do protocolo 3.2.6. i.p., intraperitoneal; i.t., intratraqueal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados.

3.2.7 Participação de neurônios sensoriais que expressam TRPV1 no extravasamento plasmático induzido por capsaicina e captopril na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados

Ratos Wistar neonatos (com 48 horas de vida) receberam uma injeção subcutânea (s.c.) de capsaicina (50 mg/kg) ou seu respectivo veículo (etanol - Tween 80 - NaCl 0,9% na proporção 1:1:8) como descrito previamente por Jancsó, Kiraly & Jancsó-Gábor (1977).

Para verificar se houve degeneração das fibras C expressando TRPV1, seis a oito semanas após o tratamento neonatal com capsaicina, os animais foram submetidos ao teste de limpeza do olho. Neste, administrou-se capsaicina (1 nmol/10 µl) no olho direito e contabilizou-se o número de movimentos de limpeza ocular observados durante cinco minutos (ROGERIO, ANDRADE & CALIXTO, 2011).

Animais adultos que limpam seus olhos com menos de 3 movimentos foram considerados positivos para degeneração de fibras TRPV1 positivas e foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via i.p. e mecanicamente ventilados. Um minuto após a injeção i.v. do corante azul de Evans os ratos foram tratados com doses de capsaicina i.t. (1 nmol/100 µl) ou captopril i.v. (2,5 mg/kg) previamente selecionadas. Quinze ou dez minutos após a administração de capsaicina ou captopril, respectivamente, realizou-se o procedimento de perfusão transcardíaca e a traqueia e o brônquio foram removidos, possibilitando após 24 horas em formamida

a mensuração e quantificação da quantidade de corante extraída conforme protocolo descrito anteriormente. O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 8).

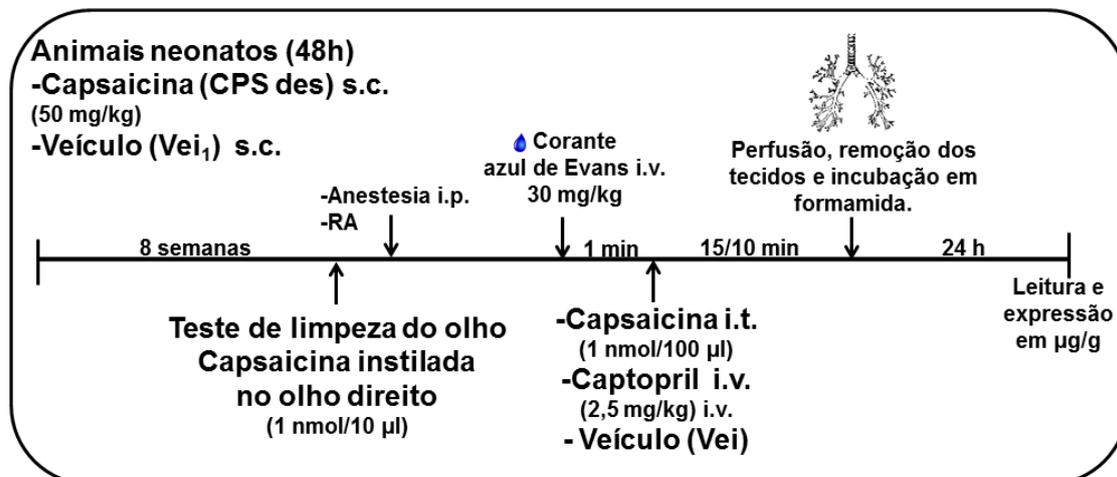


FIGURA 8: Representação esquemática do protocolo 3.2.7. i.p., intraperitoneal; i.t., intratraqueal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados; s.c., subcutâneo.

3.3 DROGAS E REAGENTES

Bradicinina, capsaicina, captopril, azul de Evans, HOE e CPZ foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA. Cloridrato de cetamina (Quetamina[®]) foi adquirido da Vetnil Ind. e Com. de Produtos Veterinários Ltda, SP, Brasil e o cloridrato de xilazina (Xilazin[®]) da Syntec Ltda, SP, Brasil.

O dimetilsulfóxido (DMSO) P.A., a solução de formamida P.A. e o álcool etílico absoluto 99,8% foram adquiridos da Neon Comercial Ltda, SP, Brasil. O NaCl P.A. foi adquirido da Vetec química fina, RJ, Brasil.

O azul de Evans, bradicinina, captopril e HOE foram dissolvidos em NaCl 0,9%. A solução de capsaicina administrada por via i.t. foi diluída em NaCl 0,9% contendo 0,5% de DMSO.

Para o experimento de degeneração de fibras C expressando TRPV1, capsaicina foi diluída em 10% de etanol + 10% de Tween 80 + NaCl 0,9%. A CPZ foi diluída em NaCl 0,9% contendo 10% de DMSO mais 5% de Tween 80. As soluções foram diluídas no dia do experimento.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão das médias (e.p.m.) de oito a doze animais por grupo. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por meio de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls. Em todas as análises valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO CAPTOPRIL NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS RESPIRANDO ESPONTANEAMENTE E ARTIFICIALMENTE VENTILADOS

A administração de captopril i.v. (2,5 mg/kg), após 10 minutos de sua injeção, não causou extravasamento plasmático significativo na traqueia (Figura 9A) e brônquio (Figura 9B) de ratos que respiravam espontaneamente, quando comparado ao grupo tratado com o veículo de captopril.

No entanto, captopril (1, 2,5 e 5 mg/kg) promoveu um significativo aumento no extravasamento plasmático na traqueia (Figura 9A e 10A) e brônquio (Figura 9B e 10B) de ratos artificialmente ventilados, quando comparado ao grupo de animais tratados com captopril e que respiravam espontaneamente (Figuras 9A e 9B) ou quando comparado ao grupo de animais tratados com veículo de captopril durante a ventilação mecânica (Figuras 10A e 10B).

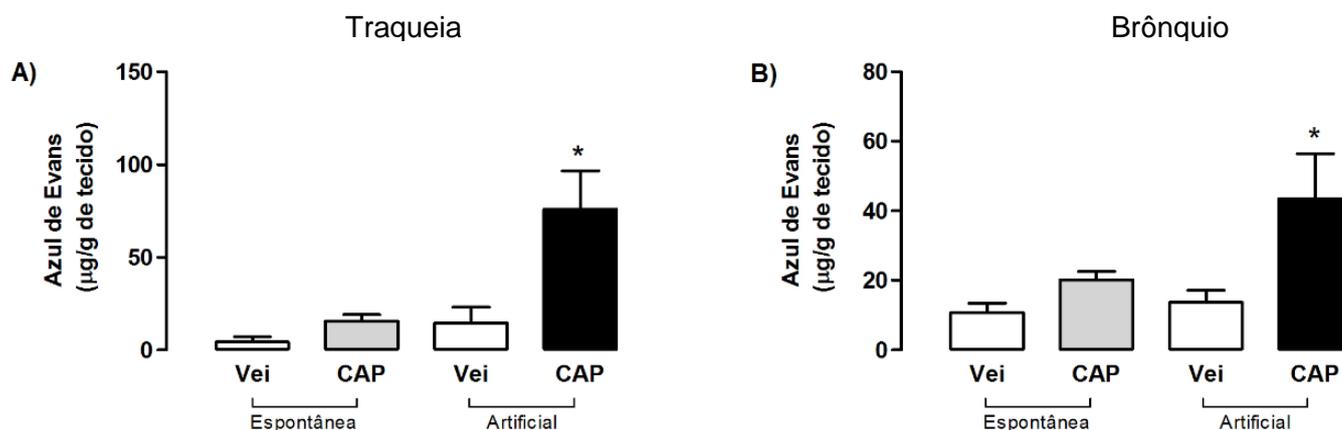


FIGURA 9: Efeito do tratamento intravenoso (i.v.) com captopril no extravasamento plasmático do corante azul de Evans na traqueia (A) e brônquio (B) de ratos respirando espontaneamente (E) ou artificialmente (A). Ratos foram tratados com captopril (CAP, 2,5 mg/kg, i.v.) ou seu veículo (Vei, i.v.) durante a respiração espontânea ou ventilação artificial. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de 8 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ comparado com o grupo tratado com captopril (CAP) durante a respiração espontânea.

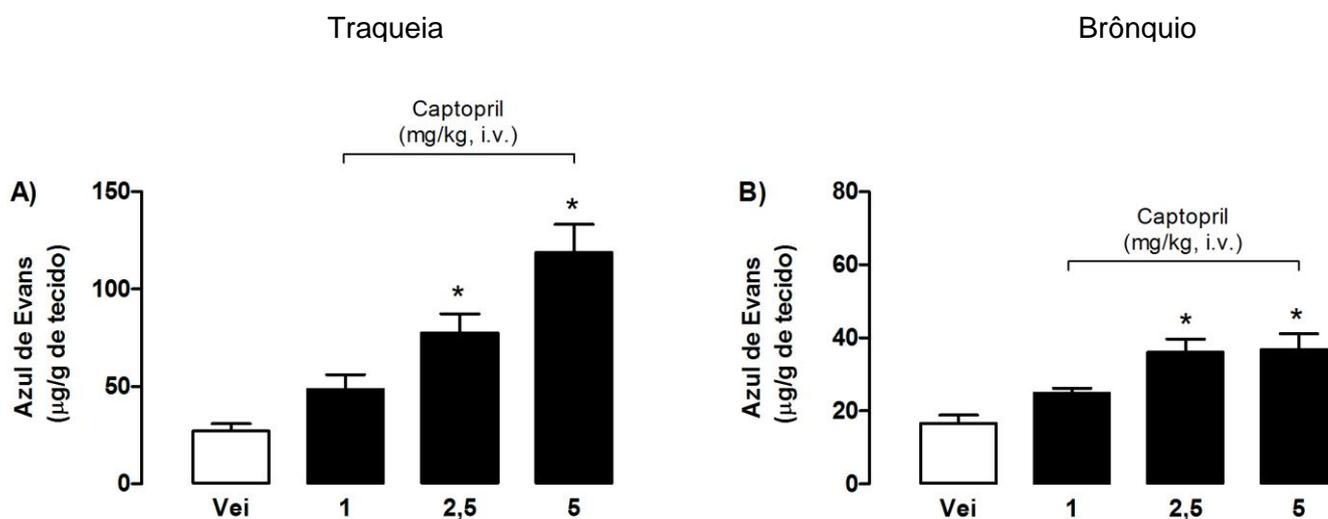


FIGURA 10: Curva dose-resposta para o extravasamento plasmático induzido pelo tratamento intravenoso (i.v.) com captopril na traqueia (A) e brônquio (B) de ratos artificialmente ventilados. Ratos foram tratados com captopril (1, 2,5 ou 5 mg/kg, i.v.) ou seu veículo (Vei, i.v.) durante a ventilação artificial. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo tratado com veículo (Vei).

4.2 EFEITO DA CAPSAICINA E BRADICININA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS ARTIFICIALMENTE VENTILADOS

Capsaicina (1 – 5 nmol/100 µl) instilada intratraquealmente 15 minutos antes da perfusão transcardíaca aumentou significativamente o extravasamento plasmático na traqueia (Figura 11A) e brônquio (Figura 11B) de ratos artificialmente ventilados quando comparado com o grupo tratado com seu veículo i.t..

Semelhantemente, a administração de bradicinina (1 – 30 nmol/100 µl; i.t.) 15 minutos antes da perfusão transcardíaca também causou extravasamento plasmático na traqueia (Figura 11C) e brônquio (Figura 11D) de ratos mecanicamente ventilados.

As doses de 10 e 30 nmol/100 µl de bradicinina produziram um aumento significativo no extravasamento de plasma quando comparado com ratos tratados com o seu veículo i.t..

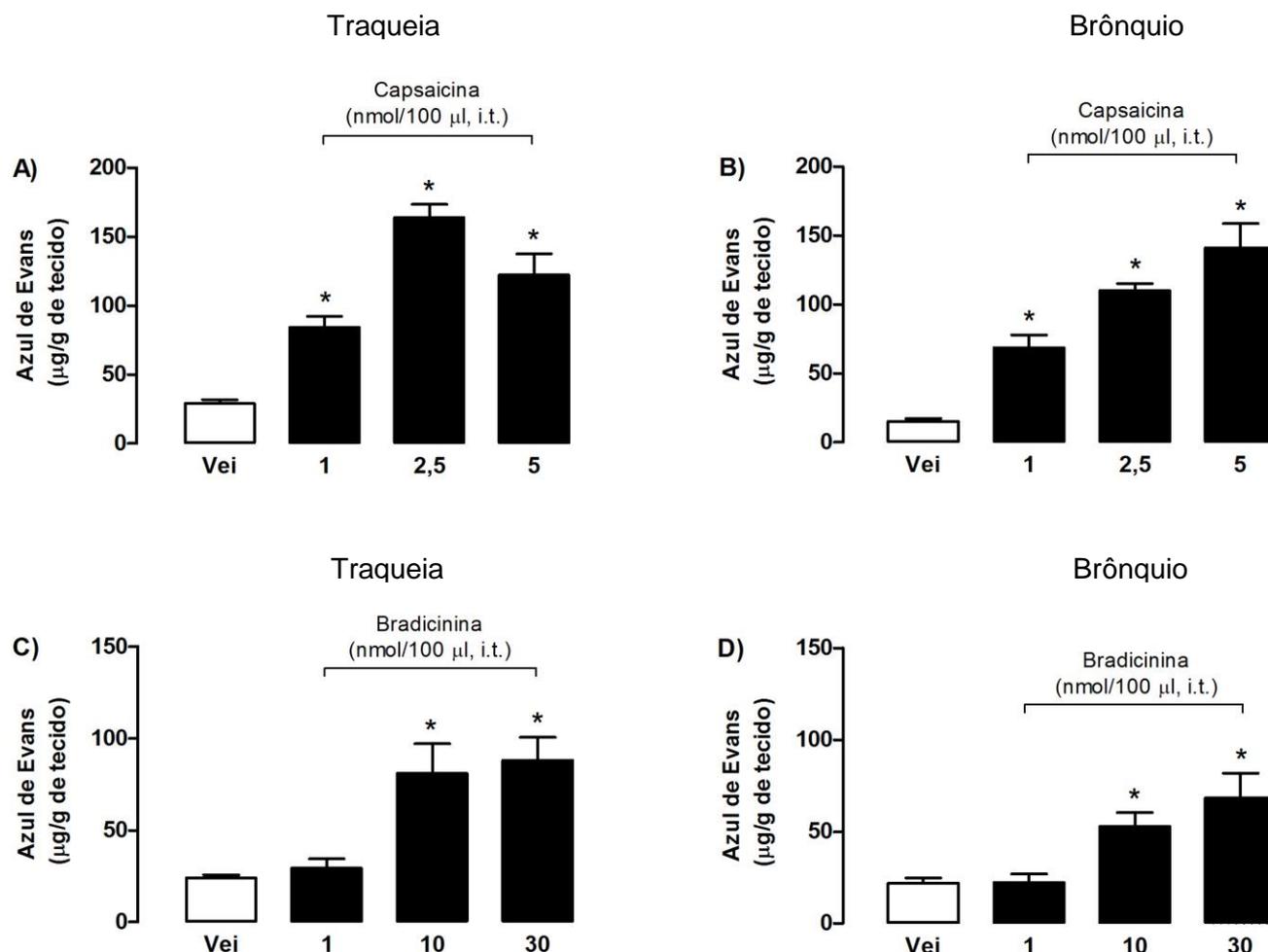


FIGURA 11: Curvas dose-resposta para o extravasamento plasmático causado pelo tratamento intratraqueal (i.t.) com capsaicina ou bradycinin na traqueia (A,C) e brônquio (B,D) de ratos sob ventilação mecânica. Ratos artificialmente ventilados foram tratados com capsaicina (1 – 5 nmol/100 μl , i.t.), bradycinin (1 – 30 nmol/100 μl , i.t.), ou seus respectivos veículos (Vei, i.t.). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com veículo (Vei).

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATRAQUEAL DOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR TRPV1 E B_2 NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA CAPSAICINA E BRADICININA NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS ARTIFICIALMENTE VENTILADOS

O aumento no extravasamento plasmático induzido pela capsaicina (1 nmol/100 μl , i.t.) na traqueia ($104,8 \pm 8,6 \mu\text{g/g}$) e brônquio ($97,4 \pm 5,6 \mu\text{g/g}$) de ratos anestesiados e mecanicamente ventilados foi significativamente reduzido pelo pré-tratamento, 15 minutos antes, com CPZ (100 nmol/100 μl , i.t.) na traqueia ($54,7 \pm 6,5$

$\mu\text{g/g}$; Figura 12A) e brônquio ($61,5 \pm 9,6 \mu\text{g/g}$; Figura 12B) de ratos quando comparado com o grupo de animais pré-tratados com o veículo do antagonista CPZ.

Adicionalmente, o extravasamento plasmático induzido pela instilação de bradicinina ($10 \text{ nmol}/100 \mu\text{l}$, i.t.) na traqueia ($80,9 \pm 16 \mu\text{g/g}$) e brônquio ($52,7 \pm 7,6 \mu\text{g/g}$) de ratos retornou aos valores basais de extravasamento após o pré-tratamento, 15 minutos antes, com HOE ($10 \text{ nmol}/100 \mu\text{l}$, i.t.) na traqueia ($16,4 \pm 4,1 \mu\text{g/g}$; Figura 13A) e brônquio ($17 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$; Figura 13B) de ratos mecanicamente ventilados quando comparados com animais pré-tratados com o veículo do antagonista HOE.

Interessantemente, o extravasamento de proteínas plasmáticas induzido pela bradicinina na traqueia ($50,3 \pm 5,9 \mu\text{g/g}$) e brônquio ($81,3 \pm 11,4 \mu\text{g/g}$) dos animais foi também significativamente reduzido pelo pré-tratamento com CPZ ($100 \text{ nmol}/100 \mu\text{l}$, i.t.) na traqueia ($28,3 \pm 4,2 \mu\text{g/g}$; Figura 13C) e brônquio ($48,1 \pm 5,8 \mu\text{g/g}$; Figura 13D) quando comparado com o grupo de animais pré-tratados com o veículo deste antagonista.

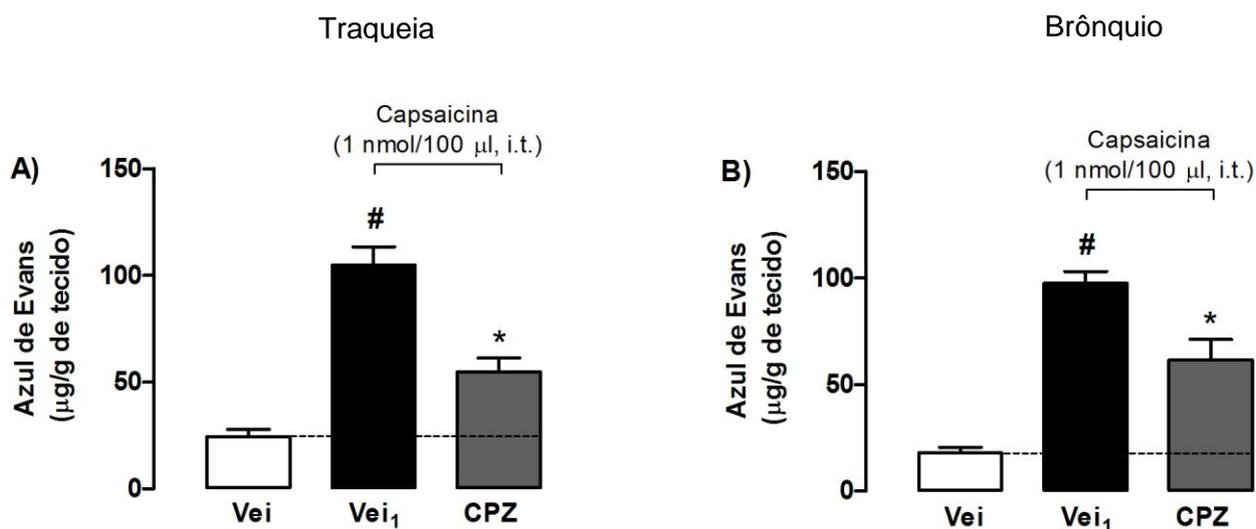


FIGURA 12: Efeito do pré-tratamento intratraqueal (i.t.) com o antagonista seletivo do receptor TRPV1 capsazepina no extravasamento plasmático induzido pela instilação intratraqueal de capsaicina na traqueia (A) e brônquio (B) de ratos artificialmente ventilados. Ratos sob ventilação mecânica foram pré-tratados com capsazepina (CPZ, $100 \text{ nmol}/100 \mu\text{l}$, i.t.) ou seu veículo (Vei₁, i.t.) 15 minutos antes da instilação de capsaicina (CPS, $1 \text{ nmol}/100 \mu\text{l}$, i.t.). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ comparado com o grupo pré-tratado com veículo do antagonista (Vei₁). # $P \leq 0,05$ comparado com o grupo pré-tratado com o veículo 15 minutos antes da instilação do veículo de capsaicina (Vei).

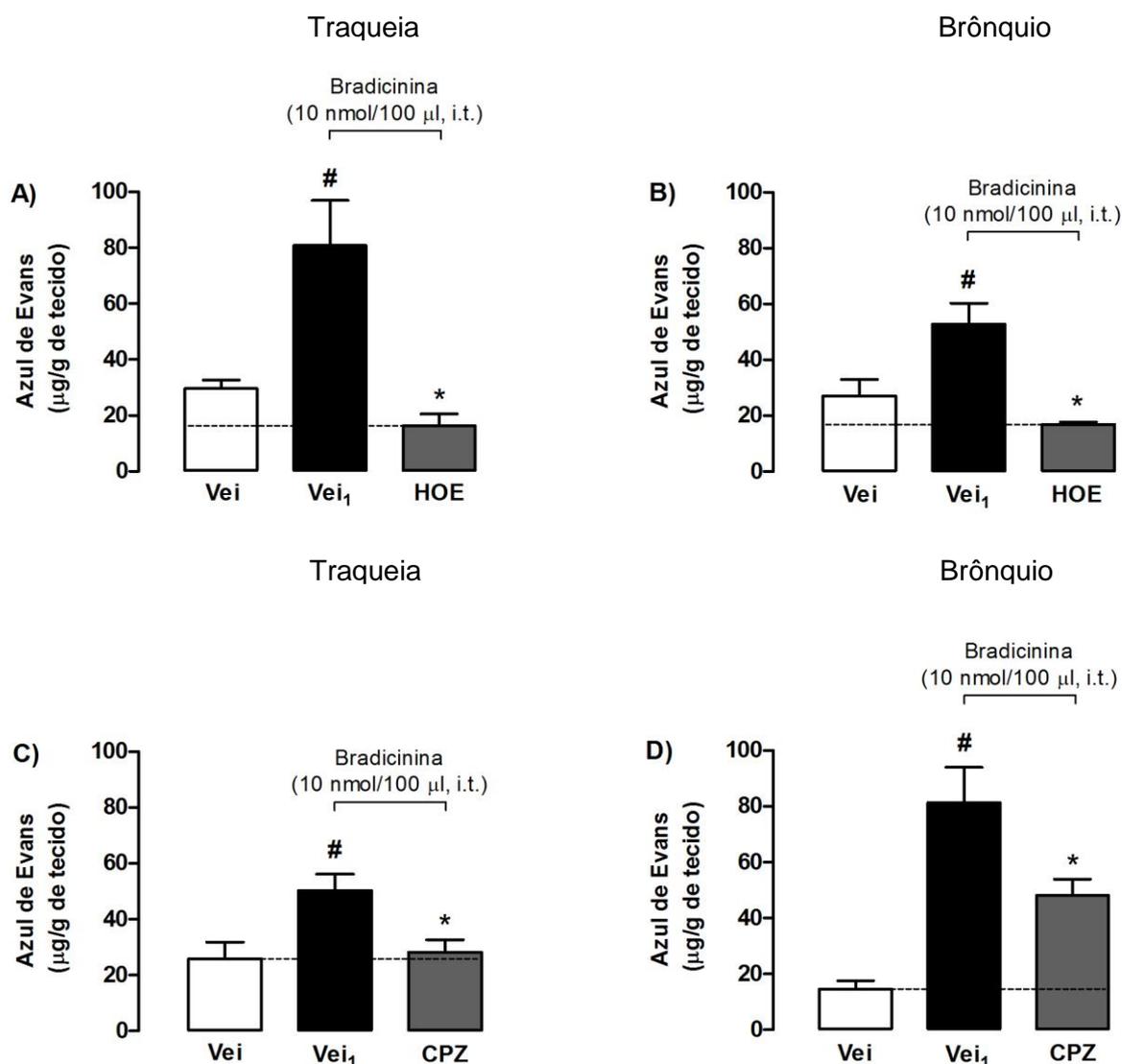


FIGURA 13: Efeito do pré-tratamento intratraqueal (i.t.) com antagonista seletivo do receptor B₂ Hoe 140 ou com o antagonista seletivo do receptor TRPV1 capsazepina no extravasamento plasmático induzido pela instilação intratraqueal de bradicinina na traqueia (A,C) e brônquio (B,D) de ratos artificialmente ventilados. Ratos artificialmente ventilados foram pré-tratados com Hoe 140 (HOE, 10 nmol/100 µl, i.t.), capsazepina (CPZ, 100 nmol/100 µl, i.t.) ou seus respectivos veículos (Vei₁, i.t.) 15 minutos antes do tratamento com bradicinina (BK, 10 nmol/100 µl, i.t.). Cada coluna representa a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo. *P≤0,05 comparado com o grupo pré-tratado com veículo (Vei₁). #P≤0,05 comparado com o grupo pré-tratado com veículo 15 minutos antes da instilação do veículo de bradicinina (Vei).

4.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRATRAQUEAL DOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR TRPV1 E B₂ NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELO CAPTOPRIL NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS ARTIFICIALMENTE VENTILADOS

A administração de captopril (2,5 mg/kg, i.v.) produziu um aumento do extravasamento plasmático na traqueia ($57,8 \pm 9,8 \mu\text{g/g}$) e brônquio ($47,8 \pm 6,6 \mu\text{g/g}$) de ratos mecanicamente ventilados. O extravasamento induzido por captopril retornou a valores basais após o pré-tratamento com HOE (10 nmol/100 μl , i.t.) na traqueia ($23,9 \pm 4,5 \mu\text{g/g}$; Figura 14A) e foi significativamente reduzido no brônquio ($28 \pm 3,2 \mu\text{g/g}$; Figura 14B), quando comparado com animais que foram pré-tratados com o veículo deste antagonista.

Adicionalmente, o extravasamento plasmático induzido pelo captopril (2,5 mg/kg, i.t.) na traqueia ($77,2 \pm 14,6 \mu\text{g/g}$) e brônquio ($53,4 \pm 6 \mu\text{g/g}$) de animais mecanicamente ventilados foi eficazmente reduzido pelo pré-tratamento i.t., 15 minutos antes, com CPZ (100 nmol/100 μl , i.t.) na traqueia ($34,4 \pm 3,7 \mu\text{g/g}$; Figura 14C) e brônquio ($28 \pm 3 \mu\text{g/g}$; Figura 14D) quando comparado com o grupo de animais pré-tratados com o veículo deste antagonista.

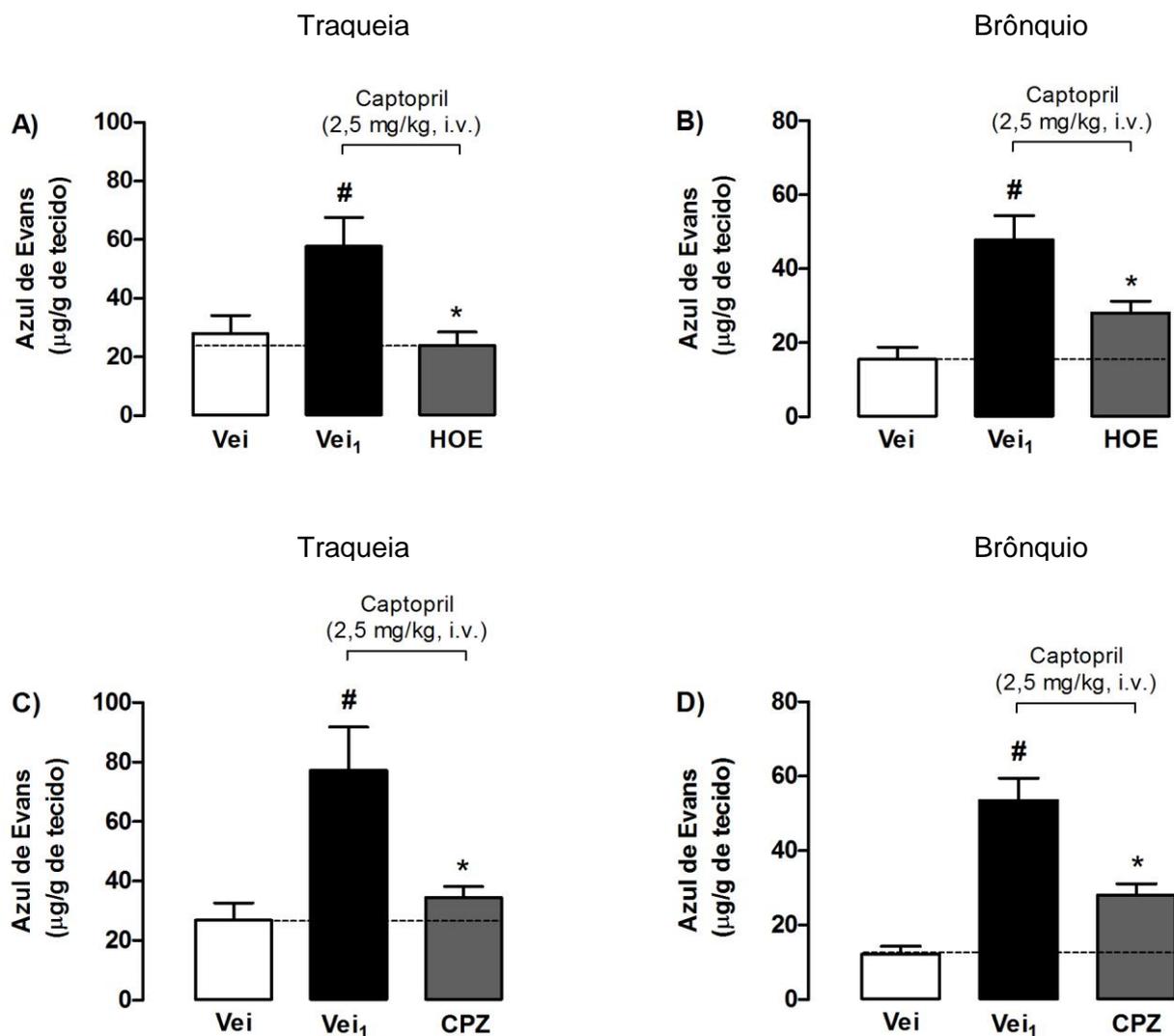


FIGURA 14: Efeito do pré-tratamento intratraqueal (i.t.) com o antagonista do receptor B₂ Hoe 140 ou com o antagonista do receptor TRPV1 capsazepina no extravasamento plasmático induzido pelo tratamento agudo com captopril na traqueia (A,C) e brônquio (B,D) de ratos artificialmente ventilados. Ratos sob ventilação mecânica foram pré-tratados com Hoe 140 (HOE, 10 nmol/100 μl , i.t.), capsazepina (CPZ, 100 nmol/100 μl , i.t.) ou seus respectivos veículos (Vei₁, i.t.) 15 minutos antes do tratamento com captopril (CAP, 2,5 mg/kg, i.v.) Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de 10 animais por grupo, * $P \leq 0,05$ comparado com o grupo pré-tratado com o veículo do antagonista (Vei₁). # $P \leq 0,05$ comparado com o grupo pré-tratado com veículo do antagonista 15 minutos antes da injeção do veículo do captopril (Vei).

4.5 EFEITOS DA COADMINISTRAÇÃO INTRATRAQUEAL DOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE BRADICININA B₂ E TRPV1 EM BAIXAS DOSES NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELO IECA NAS VIAS AÉREAS

O extravasamento plasmático induzido pelo captopril na traqueia ($96,7 \pm 9,4$ $\mu\text{g/g}$) e brônquio ($54,7 \pm 6$ $\mu\text{g/g}$) de ratos mecanicamente ventilados foi significativamente reduzido na traqueia ($33,3 \pm 5,8$ $\mu\text{g/g}$; Figura 15A) e brônquio ($25,8 \pm 3,5$ $\mu\text{g/g}$; Figura 15B) pelo pré-tratamento com a coadministração i.t. de CPZ (3 nmol/50 μl , i.t.) e HOE (1 nmol/50 μl , i.t.) (doses que *per se* foram incapazes de promover uma resposta inibitória) quando comparado com o grupo pré-tratado com seus respectivos veículos.

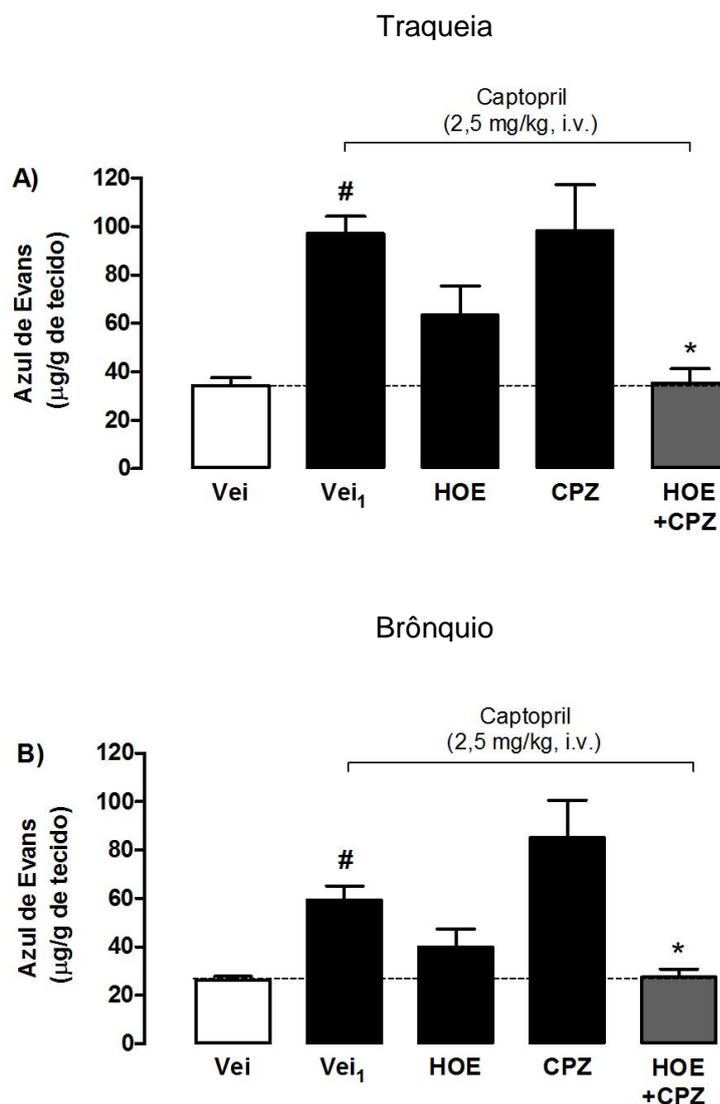


FIGURA 15: Efeito do pré-tratamento intratraqueal (i.t.) com a coadministração de baixas doses dos antagonistas Hoe 140 e capsazepina no extravasamento plasmático induzido pelo tratamento agudo com captopril na traqueia (A) e brônquio (B) de ratos artificialmente ventilados. Animais sob ventilação mecânica foram pré-tratados com baixas doses de Hoe 140 (HOE, 1 nmol/100 µl) e capsazepina (CPZ, 3 nmol/100 µl) isoladamente, em associação (HOE+CPZ, 1 nmol/50 µl mais 3 nmol/50 µl, i.t. respectivamente) ou com seus respectivos veículos (Vei₁, i.t.) 15 minutos antes do tratamento com captopril (CAP, 2,5 mg/kg, i.v.). Cada coluna representa a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo. *P≤0,05 comparado com o grupo pré-tratado com o veículo dos antagonistas (Vei₁). [#]P≤0.05 comparado com o grupo pré-tratado com veículo dos antagonistas 15 minutos antes da injeção do veículo do captopril (Vei).

4.6 EFEITOS DA DEGENERAÇÃO DE NEURÔNIOS SENSORIAIS QUE EXPRESSAM TRPV1 NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA CAPSAICINA E CAPTOPRIL NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS ARTIFICIALMENTE VENTILADOS

Os resultados demonstraram que o extravasamento plasmático induzido pela capsaicina (1 nmol/100 µl, i.t.) foi abolido na traqueia ($0,28 \pm 0,2$ µg/g; Figura 16A) e retornou aos valores basais no brônquio ($12,6 \pm 6,4$ µg/g; Figura 16B) em animais adultos sob ventilação mecânica e que foram submetidos ao tratamento com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) no período neonatal, quando comparado com o grupo de animais pré-tratados com o veículo de capsaicina no período neonatal ($120,7 \pm 16$ µg/g na traqueia e $63,6 \pm 4,6$ µg/g no brônquio).

Além disso, o aumento do extravasamento plasmático induzido pelo captopril (2,5 mg/kg, i.v.) retornou aos valores basais na traqueia ($20,7 \pm 5,3$ µg/g; Figura 16C) e brônquio ($18,7 \pm 3$ µg/g; Figura 16D) de ratos mecanicamente ventilados que foram pré-tratados no período neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) quando comparado com ratos pré-tratados com o veículo de capsaicina no período neonatal ($99,4 \pm 22$ µg/g na traqueia e $45,7 \pm 11$ µg/g no brônquio).

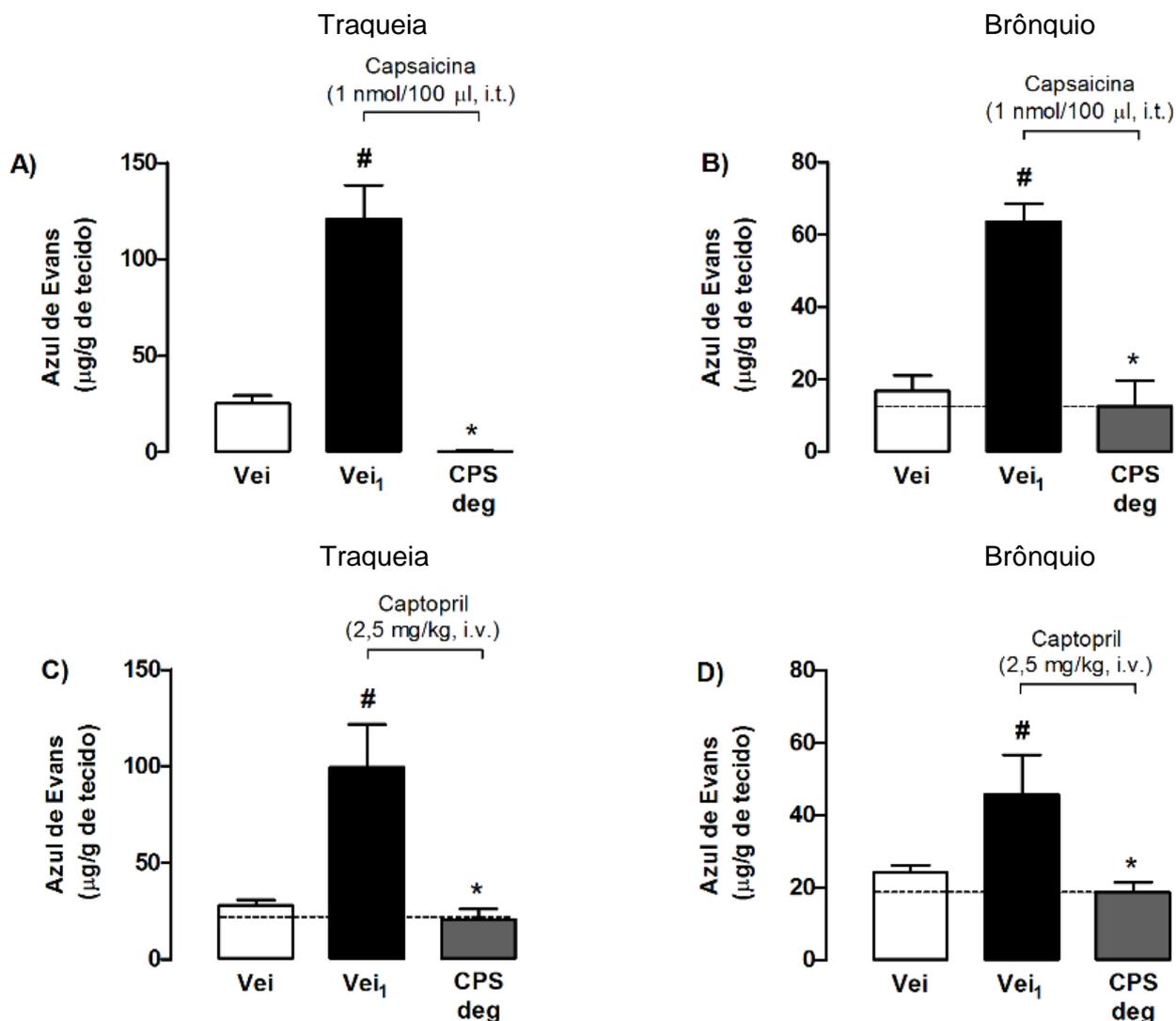


FIGURA 16: Efeito da degeneração de neurônios sensoriais que expressam o receptor TRPV1 no extravasamento plasmático induzido pela instilação intratraqueal de capsaicina ou pelo tratamento agudo com captopril na traqueia (A,C) e brônquio (B,D) de ratos artificialmente ventilados. Ratos pré-tratados com uma injeção subcutânea de capsaicina em alta dose (CPS deg, 50 mg/kg, s.c.) ou seu veículo (Vei₁, s.c.) durante o período neonatal, após oito semanas, foram submetidos a ventilação artificial e tratados com capsaicina (CPS, 1 nmol/100 μl , i.t.) ou captopril (CAP, 2,5 mg/kg, i.v.). Cada coluna representa a média \pm e.p.m. de 8 animais por grupo. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo pré-tratado com veículo durante o período neonatal (Vei₁). # $P \leq 0,05$ comparado ao grupo pré-tratado com veículo durante o período neonatal, oito semanas antes da injeção do veículo de captopril (Vei).

5. DISCUSSÃO

Diretrizes recentes (2013-2014) para o gerenciamento da hipertensão revelam que os IECAs ainda são recomendados como fármacos de primeira escolha no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, pós-infarto do miocárdio, e para retardar a progressão do diabetes tipo 1 e 2 e a nefropatia não diabética (ACHARYA et al., 2003; REGOLI & GOBEIL, 2015).

Os efeitos terapêuticos dos IECAs dependem em grande parte do bloqueio do SRAA. No entanto, o aumento dos níveis plasmáticos de cininas também pode contribuir com efeitos cardiovasculares adicionais. Autores relataram que os níveis plasmáticos de bradicinina aumentam durante o tratamento com IECAs devido à diminuição do seu metabolismo por inibição da ECA (BERNSTEIN et al., 2013). De fato, Cugno et al. (2005) demonstraram que o tratamento crônico com IECAs em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva aumentou os níveis plasmáticos de bradicinina.

Assim, a bradicinina, por sua vez, pode exercer várias ações de proteção no endotélio, como vasodilatação, a prevenção da formação de trombos e, possivelmente, de placas ateroscleróticas (REGOLI & GOBEIL, 2015). Esses efeitos adicionais melhoram o prognóstico dos pacientes e diferenciam os IECAs dos demais anti-hipertensivos disponíveis no mercado, como por exemplo, dos bloqueadores do receptor de angiotensina (ARBs), embora fossem, por muitos anos, considerados intercambiáveis por inibirem o SRAA (SATO & FUKUDA, 2015).

Portanto, IECAs destacam-se por serem os únicos anti-hipertensivos capazes de reduzir propriamente o desbalanço entre o SRAA e o sistema caliceína-cininas, restaurando a homeostasia cardiovascular ótima e reduzindo significativamente a morbidade e o risco das várias causas de mortalidade nos indivíduos afetados pela hipertensão e outras doenças cardíacas (REGOLI & GOBEIL, 2015).

Por outro lado, este aumento nos níveis de bradicinina também parece estar envolvido no mecanismo dos efeitos adversos, como tosse seca não produtiva e angioedema, reportados por pacientes que fazem o uso IECAs, e que estão frequentemente relacionados com uma baixa adesão à terapia. Embora o mecanismo protetor e benéfico da bradicinina no sistema cardiovascular esteja bem documentado, o mecanismo exato pelo qual bradicinina promove esses efeitos adversos, após o tratamento com IECAs, não está completamente elucidado (FOX et al., 1996; TAKAHAMA et al., 1996; EMANUELI et al., 1998).

Evidências apontam que bradicinina, por ser um notório agente pró-inflamatório, pode através de suas ações resultantes de interações complexas entre o seu receptor B₂ e mecanismos moleculares adicionais, acentuar reações defensivas nas vias aéreas (MAURER et al., 2011; REGOLI, PLANTE & GOBEIL, 2012).

Além disso, em fibras aferentes primárias vagais peptidérgicas das vias aéreas, receptores B₂ podem estar coexpressos e aumentar a probabilidade de abertura de receptores TRPV1 (VELDHUIS et al., 2015), canais de cátions não seletivos que tem sido extensivamente investigados na regulação das funções das vias aéreas em condições normais e patofisiológicas.

Nesse sentido, utilizando um modelo animal de extravasamento plasmático, um importante componente do processo inflamatório e angioedema, investigou-se se o receptor TRPV1 estaria envolvido no mecanismo pelo qual captopril induz este efeito na traqueia e brônquio de ratos.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a administração intravenosa de captopril, após 10 minutos, não causou extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos que respiravam espontaneamente. No entanto, curiosamente, observou-se que houve um significativo aumento no extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos mecanicamente ventilados após a administração de captopril.

O protocolo utilizado em nosso modelo para ratos respirando espontaneamente foi o mesmo empregado por Baluk e colaboradores (1999). Porém, nossos resultados obtidos com ratos respirando espontaneamente diferiram dos obtidos por estes autores. Baluk et al. (1999) demonstraram que 10 minutos após a administração de captopril ocorreu um significativo aumento do extravasamento do corante azul de Evans na traqueia de camundongos que respiravam espontaneamente. Esses resultados aparentemente contraditórios poderiam ser explicados pelo fato de que os autores utilizaram camundongos C57BL/6 isentos de agentes patogênicos, enquanto no presente estudo utilizou-se ratos da variedade Wistar. Assim, não se pode descartar a possibilidade de que essa linhagem de camundongos livres de patógenos ser mais sensível a responder a alterações como, por exemplo, ao aumento da permeabilidade vascular induzida por captopril quando comparado com ratos Wistar.

Por outro lado, Emanuelli et al. (1998) relataram que o tratamento com captopril, após 10 minutos, não induziu extravasamento plasmático na traqueia de camundongos que respiravam espontaneamente. Esses dados estão em conformidade com os resultados obtidos no presente estudo. No trabalho de Emanuelli et al., (1998) os autores observaram que o tempo foi um fator determinante para promover um aumento do extravasamento plasmático. De fato, eles observaram

um aumento no extravasamento plasmático somente 15 ou 30 minutos após a administração de captopril, sugerindo que esse efeito do IECA seja dependente do tempo, provavelmente devido a um ou mais peptídeos que se acumulam no plasma e/ou tecido (EMANUELI et al., 1998). Entretanto, em nossos experimentos o fator determinante para o tratamento com captopril, após 10 minutos, induzir um significativo aumento do extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos foi a ventilação mecânica.

Assim, a associação de captopril com a ventilação mecânica foi crucial para provocar extravasamento plasmático em nosso modelo, uma vez que, confirmando nossa hipótese, o extravasamento plasmático foi observado somente em ratos ventilados mecanicamente e após o tratamento com captopril, mas não após o tratamento com seu respectivo veículo.

Sendo assim, é possível sugerir que, sob essas condições, a administração de captopril, após 10 minutos, incapaz de causar extravasamento plasmático em ratos que respiravam espontaneamente, estaria inibindo a ECA e aumentando os níveis plasmáticos de bradicinina, capaz de sensibilizar canais em neurônios sensoriais.

Dados da literatura tem demonstrado que o receptor TRPV1 pode ser experimentalmente ativado por vários estímulos, incluindo estímulos mecânico ou químico (TAKEMURA et al., 2008). Adicionalmente, está bem estabelecido que uma grande variedade de mediadores pró-inflamatórios (prostaglandina E₂ e bradicinina, por exemplo) e fatores de crescimento liberados durante processos inflamatórios, por ativar seus respectivos receptores expressos em fibras nervosas sensoriais, podem promover a sensibilização do canal TRPV1, principalmente por meio da ativação de proteínas quinases capazes de fosforilar o receptor (PKA, PKC, MAPKs entre outras) (BHAVE et al., 2003; MICKLE, SHEPHERD, & MOHAPATRA, 2015).

Assim, quando sensibilizado, o limiar de ativação do canal TRPV1 diminui e a probabilidade de sua abertura aumenta, contribuindo para a transdução da sinalização nociva de estímulos normalmente inócuos, o que pode, por exemplo, causar uma ativação constitutiva do canal a temperaturas fisiológicas, ou potencializar o efeito de estímulos químicos, físicos, térmicos ou mecânicos (SUGIURA et al., 2002; ADCOCK, 2009).

De fato, por meio de estudos *in vitro*, autores demonstraram que a sensibilização do receptor reduziu seu limiar de ativação ao calor de uma temperatura de 42°C para 34°C, o que pode fazer com que estímulos térmicos não nocivos (como a temperatura corporal) tornem-se capazes de ativá-lo. E ainda, autores relataram que a ativação do receptor TRPV1 por ação de prótons, capsaicina ou anandamida foi potencializada em canais previamente fosforilados (PREMKUMAR & AHERN, 2000;

TOMINAGA, WADA & MASU, 2001; VELLANI et al., 2001; SUGIURA et al., 2002; TREVISANI et al., 2002).

Por esse motivo, o receptor TRPV1 pode agir como um amplificador molecular em neurônios sensoriais e sua sensibilização estar envolvida na ocorrência de hiperalgesia na dor crônica e de hiperresponsividade nas vias aéreas (ADCOCK, 2009).

Uma vez que autores demonstraram que IECAs, como por exemplo, o captopril, aumentam os níveis plasmáticos de bradicinina (BERNSTEIN et al., 2013) e que bradicinina pode sensibilizar o receptor TRPV1, aumentando a probabilidade de abertura desse canal (HWANG et al., 2000), é possível sugerir que captopril, em uma dose que não causa extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos respirando espontaneamente, pode ser capaz de sensibilizar o receptor TRPV1. Assim, o canal sensibilizado poderia responder a vários estímulos incluindo, possivelmente, o estímulo mecânico produzido por meio da ventilação artificial.

Nesse sentido, HSU et al. (2009) demonstraram em seu estudo que a infusão de NADA, um agonista endógeno do receptor TRPV1 e de receptores canabinóides do tipo CB1, induz um efeito potencializador não específico sobre a sensibilidade a estimulação mecânica induzida por inflação dos pulmões em fibras aferentes vagais pulmonares sensíveis à capsaicina de ratos mecanicamente ventilados, um efeito mediado através da ativação do receptor TRPV1.

De fato, apesar do receptor TRPV1 ser um canal que responde mais a estímulos térmicos e químicos algumas evidências relataram o papel do receptor TRPV1 para a mecanossensibilidade, especialmente nas vísceras, participando da detecção de estímulos mecânicos nocivos (estiramento) na parede do cólon (JONES, XU & GEBHART, 2005), do controle da resposta do urotélio da bexiga ao estiramento (DALY et al., 2007) ou, ainda, como mecanoreceptores nos rins de ratos (FENG et al., 2008).

Adicionalmente, confirmando que a bradicinina pode sensibilizar o receptor TRPV1 e promover extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos, mostrou-se primeiramente que a capsaicina, como esperado, causou extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos ventilados artificialmente, um efeito que foi inibido pelo pré-tratamento com CPZ. Além disso, foi observado que bradicinina também causou extravasamento plasmático do corante azul de Evans na traqueia e brônquio de animais mecanicamente ventilados.

Este efeito, como esperado, foi inibido pelo pré-tratamento i.t. com o antagonista seletivo do receptor B₂ HOE. Contudo, interessantemente no presente modelo, o extravasamento plasmático induzido por bradicinina foi também inibido pelo

pré-tratamento i.t. com CPZ. Sendo assim, esses dados sugerem que no nosso modelo experimental o extravasamento plasmático induzido por bradicinina pode ocorrer através da ativação indireta do receptor TRPV1 via receptor B₂.

Estes resultados estão em perfeita concordância com estudos prévios que demonstraram a bradicinina promove efeitos nas vias aéreas de murinos de maneira dose-dependente diretamente via receptor B₂ (ARAKAWA et al., 1992; VALENTI et al., 2005), tais como broncoconstrição (TRAMONTANA et al., 2001), sensibilidade dos aferentes das vias aéreas (HUANG et al., 1999.), reflexo de tosse (FOX et al., 1996) e extravasamento de plasma (SARIA et al., 1983), bem como tosse e broncoconstrição quando inalada por pacientes asmáticos (GAMA LANDGRAF et al., 2004; VALENTI et al., 2005).

A ativação do receptor B₂ constitutivo medeia as principais ações farmacológicas da bradicinina nas vias aéreas, uma vez que altas concentrações de bradicinina são requeridas para a ativação do receptor B₁, que tem preferência por seus metabólitos des-Arg e estão presentes em baixos níveis (ou ausentes) em tecidos normais, apesar de serem rapidamente sintetizados nas vias aéreas e outros tecidos durante processos inflamatórios. Em adição, bradicinina pode promover seus efeitos por meio de mecanismos indiretos envolvendo a liberação de metabólitos do ácido araquidônico (CALIXTO et al., 2000; MOREAU et al., 2005; RHALEB, YANG & CARRETERO, 2011).

Além disso, muitos estudos demonstraram que a bradicinina pode sensibilizar e ativar outros receptores, por exemplo, aumentar a probabilidade de abertura do receptor TRPV1, envolvido em uma variedade de processos sensoriais (PETHO & REEH, 2012; JULIUS, 2013).

Kollarik e Undem (2004) relataram por meio de experimentos realizados em camundongos com deleção do receptor TRPV1, que este canal possui um papel modulatório sobre a ativação de fibras C broncopulmonares vagais induzida por bradicinina. E ainda, reforçando essa interação, achados da literatura demonstraram que bradicinina possui a habilidade de sensibilizar o receptor TRPV1 em fibras C aferentes isoladas das vias aéreas de cobaias (FOX et al., 1996; GRACE et al., 2012).

A modulação do receptor TRPV1 por bradicinina pode ocorrer via ativação do seu receptor B₂, acoplado a diferentes tipos de proteínas G, promovendo a ativação da enzima PLC β , que hidrolisa o fosfolípido de membrana PIP₂, aumentando os níveis dos segundo mensageiros, IP₃ e DAG (CHUANG et al., 2001) e proporcionando a ativação de isoformas específicas de PKC que fosforilam e estimulam o canal (PREMKUMAR & AHERN, 2000).

Adicionalmente, a ativação do receptor B₂ por bradicinina é capaz de estimular a liberação de ácido araquidônico, que por ação da enzima LOX é convertido em mediadores lipídicos, por exemplo, 12 e 15-HPETEs, capazes de ativar diretamente o receptor do lado citoplasmático (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; PETHO & REEH, 2012). Assim, a bradicinina por meio destas vias de transdução de sinal, envolvendo a ativação da PKC e a mobilização de ácido araquidônico, pode finalmente convergir para um objetivo em comum, por exemplo, o receptor TRPV1.

Corroborando nossos resultados, autores também demonstraram que CPZ inibiu a descarga de potencial de ação induzida por bradicinina em fibras C traqueais de cobaias (CARR et al., 2003) e que bradicinina *in vivo* produz nocicepção mediante estimulação do receptor TRPV1 em camundongos (FERREIRA, DA SILVA & CALIXTO, 2004).

Recentemente, Grace e colaboradores (2012) também demonstraram que a resposta tussígena induzida por bradicinina em um modelo de tosse em cobaias foi parcialmente inibida pelo pré-tratamento com um antagonista do receptor TRPV1 e Mistry et al. (2014) também evidenciaram um aumento da expressão de RNAm TRPV1 em uma cultura de neurônios sensoriais primários de ratos, bem como uma significativa responsividade após a exposição de bradicinina *in vitro*. Assim, com base nas evidências reportadas acima e nos presentes resultados, é possível postular uma clara interação entre o receptor TRPV1 e o receptor B₂.

Frente a essas considerações, se hipotetizou que alguns efeitos adversos nas vias aéreas promovidos durante o tratamento com IECA, poderiam ocorrer por uma interação entre o receptor TRPV1 e a ativação de receptores B₂, em virtude da inibição da degradação da bradicinina alcançada com a inibição da ECA.

Interessantemente, os resultados do presente estudo demonstraram que o extravasamento plasmático induzido por captopril na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados foi inibido por HOE. Estes achados corroboram com dados anteriores apresentados por Emanuelli et al. (1998), que demonstraram que o pré-tratamento com HOE ou com o antagonista do receptor de taquicininas NK1 SR 140333 inibiu significativamente o aumento do extravasamento plasmático induzido por captopril em camundongos.

Os autores também demonstraram a ausência do extravasamento plasmático induzido por captopril em camundongos com deleção genética do receptor B₂, e adicionalmente, que o aumento do extravasamento plasmático e a vasodilatação produzidos pela administração aguda de captopril ocorrem por mecanismos distintos (EMANUELI et al., 1998). Na verdade, eles mostraram que HOE inibiu o extravasamento de plasma, mas falhou em reduzir a hipotensão induzida por captopril,

sugerindo que o aumento dos níveis de cininas promove um aumento na permeabilidade vascular, mas não desempenha um papel importante na resposta vasodilatadora para o captopril (EMANUELI et al., 1998).

Na mesma direção, um estudo recente demonstrou que pacientes acometidos por angioedema associado ao tratamento com IECA recuperaram a função normal de suas vias aéreas por meio da administração de uma única injeção subcutânea do antagonista do receptor B₂ HOE (BAS et al., 2010).

Em relação ao envolvimento do receptor TRPV1 no extravasamento plasmático induzido pelo captopril, observou-se que o pré-tratamento com CPZ e a coadministração de HOE mais CPZ em doses que *per se* não causam efeitos inibitórios, inibiu significativamente o extravasamento plasmático induzido pelo tratamento agudo com captopril em ratos mecanicamente ventilados. Esses resultados sugerem fortemente um novo mecanismo pelo qual IECAs podem induzir extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos e fornecem evidências que o extravasamento plasmático induzido por captopril em ratos que respiravam artificialmente pode ter ocorrido, pelo bloqueio da ECA que por sua vez promoveu o aumento dos níveis de bradicinina, resultando em sensibilização do receptor TRPV1.

Assim, hipotetizou-se que a sensibilização do receptor TRPV1 após o tratamento com captopril poderia causar um estado de hipersensibilidade nas vias aéreas dos animais e reduzir o limiar de ativação do canal para a ventilação mecânica, devido à ativação do receptor B₂ por bradicinina. Desse modo, a ativação do receptor contribuiria com a promoção de respostas reflexas mediadas centralmente, e também com reflexos axonais locais mediante a liberação de neuropeptídeos sensoriais de terminais sensoriais, como SP, CGRP e neurocinina A, que podem ocasionar inflamação neurogênica, um evento caracterizado por extravasamento plasmático e vasodilatação (GEPETTI, MATERAZZI & NICOLETTI, 2006; LIN et al., 2014).

Confirmando nossa hipótese e os dados obtidos através do bloqueio farmacológico com antagonista CPZ, o tratamento com uma alta dose de capsaicina em ratos neonatos, induzindo neurodegeneração de nervos sensoriais que expressam TRPs como o receptor TRPV1, aboliu completamente o extravasamento plasmático induzido pela administração de capsaicina e pelo tratamento agudo com captopril em ratos adultos artificialmente ventilados.

A capsaicina quando administrada em ratos no período neonatal em dose elevada promove a destruição irreversível de fibras aferentes primárias sensoriais sensíveis a capsaicina (JANCSÓ, KIRALY & JANCSÓ-GÁBOR, 1977). Estudos relataram que o Ca²⁺ desempenha um papel importante na iniciação de pelo menos três mecanismos responsáveis por promover essa destruição, entre eles, o efeito

inibitório sobre o transporte axonal do NGF, a ação de proteases ativadas por Ca^{2+} e a apoptose induzida por dano mitocondrial e aumento de ROS (KISSIN, 2008; WATANABE et al., 2011).

Logo, capsaicina em alta dose pode ocasionar a morte de células neuronais e o bloqueio de seu transporte axonal, prevenindo completamente a ativação das fibras. E então, vários estudos utilizam a técnica para explorar características estruturais e funcionais de neurônios sensoriais primários, sendo possível avaliar a participação das fibras aferentes sensoriais TRPV1 positivas em seus experimentos (JANCSÓ, 2009; FERNANDES, FERNANDES & KEEBLE, 2012).

Sendo assim, a inibição do extravasamento plasmático por CPZ juntamente com a inabilidade de ratos tratados com capsaicina no período neonatal em responder ao tratamento agudo com captopril, em nosso modelo experimental, confirmou que neurônios sensoriais que expressam TRPV1 estão envolvidos no mecanismo pelo qual esse IECA induz sensibilização e ativação do receptor TRPV1 nas vias aéreas de ratos artificialmente ventilados. Um efeito que parece ocorrer indiretamente via ativação do receptor B_2 , por meio do aumento dos níveis de bradicinina alcançados com a inibição da ECA durante o tratamento agudo com captopril.

Tomados em conjunto, os dados da literatura e os resultados apresentados, podemos sugerir que o tratamento agudo com captopril, após 10 minutos, pode ativar ou sensibilizar indiretamente, via ativação do receptor B_2 , o receptor TRPV1, causando extravasamento plasmático nas vias aéreas de roedores.

Além disso, em nosso modelo experimental, foi possível hipotetizar que por estar sensibilizado, e, portanto, com seu limiar de ativação reduzido, o canal TRPV1 poderia se ativar quando o animal foi exposto ao estímulo mecânico, representado no estudo pela ventilação artificial das vias aéreas. Dessa forma, podemos sugerir que a ventilação mecânica, um suporte indispensável em pacientes com falência respiratória, poderia induzir complicações em pacientes tratados com captopril. Entretanto, outros estudos são necessários para avaliar se outros IECAs ou outros compostos poderiam também sensibilizar o receptor TRPV1 e produzir complicações nas vias aéreas durante a ventilação mecânica.

Alguns estudos como o de Patel e colaboradores (2013) demonstraram que enalapril induz hiperresponsividade em camundongos asmáticos artificialmente ventilados, e o estudo de Yoshihara et al. (1995) também demonstraram que a inalação de ar frio por um minuto não induziu extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos artificialmente ventilados mas foi potencializado após o pré-tratamento com fosforamidon, um inibidor da enzima endopeptidase neutra. No entanto nenhum dos autores investigou o efeito da ventilação mecânica sobre essas respostas. Assim,

com base nos comentários reportados acima e em nossos resultados, é possível sugerir que captopril precisa ser administrado cautelosamente em pacientes que necessitem de ventilação mecânica.

Adicionalmente, extrapolando nossos resultados, pode-se especular que outros efeitos adversos descritos em pacientes em tratamento com IECAs, como a tosse seca não produtiva, poderiam também ocorrer por meio da ativação indireta do receptor TRPV1 expresso nos nervos sensoriais das vias aéreas, uma vez que o receptor TRPV1 parece desempenhar um importante papel no processo que inicia e potencializa a tosse ativada por substâncias exógenas e endógenas (como mediadores pró-inflamatórios) (BENEMEI et al., 2015).

Com frequência, ativadores do receptor TRPV1 estão presentes em altas concentrações no pulmão durante doenças das vias aéreas, aumentando a sensibilidade dos reflexos das vias aéreas (VELDHUIS et al., 2015). Por essa razão, nos últimos anos, o envolvimento do receptor TRPV1 também tem sido investigado extensivamente na patogênese de doenças respiratórias como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e tosse crônica, uma vez que a tosse persistente é comumente um primeiro sinal (GRACE et al., 2013).

Interessantemente, Watanabe et al. (2008), utilizando um modelo de inflamação alérgica em cobaias, evidenciaram a ocorrência de um aumento na expressão do receptor TRPV1 em nervos aferentes sensoriais que inervam as vias aéreas.

De modo similar, porém em humanos, Groneberg et al. (2004) evidenciaram um aumento da expressão do receptor TRPV1 em nervos epiteliais das vias aéreas de pacientes com tosse crônica, bem como um aumento na sensibilidade a tosse quando expostos ao desafio com capsaicina, o que também foi evidenciado por Mitchell e colaboradores (2005) no músculo liso brônquico, e de maneira acentuada no epitélio brônquico de indivíduos asmáticos e na mucosa nasal de pacientes com rinite vasomotora (NILIUS & SZALLASI, 2014).

Nesse sentido, seria interessante estudar se a exposição a níveis aumentados de bradicinina durante o tratamento com IECA poderia alterar o fenótipo dos neurônios sensoriais e possivelmente de outras células, promovendo um aumento da atividade e expressão do receptor TRPV1, o que poderia ser determinante, por exemplo, para o aumento do reflexo à tosse e do extravasamento plasmático nestes pacientes. Além disso, TRPV1 pode ser um alvo terapêutico potencial para ação e o desenvolvimento de antagonistas do receptor, na tentativa de amenizar esses efeitos adversos que ocorrem nas vias aéreas após tratamento com IECAs.

Em adição, um estudo recente demonstrou que o influxo de cálcio através da abertura do receptor TRPV1 pode mediar a sensibilidade de outro canal TRP, o TRP anquirina 1 (TRPA1), que pode estar coexpresso em nervos aferentes vagais sensoriais das vias aéreas que expressam TRPV1, resultando em uma interação entre esses dois canais (HSU & LEE, 2015).

O receptor TRPA1 é conhecido por ser ativado por poluentes ambientais produzidos pela combustão de materiais (incluindo a acroleína e o crotonaldeído (presentes na fumaça do cigarro e principal agente causador da DPOC), isotiocianatos e compostos tiosulfinato e cinamaldeído, entre outros, conhecidos por causar irritação respiratória e extravasamento plasmático em humanos e cobaias (ANDRÉ et al., 2008).

E ainda, assim como receptor TRPV1, mediadores endógenos liberados durante processos inflamatórios, como a bradicinina, podem também sensibilizar e ativar o receptor, aumentando a chance de ambos os canais serem ativados simultaneamente durante a inflamação das vias aéreas (BANDELL et al., 2004; LIN et al., 2015).

Como resultado deste efeito sinérgico envolvendo a ativação simultânea dos canais, pode ocorrer uma amplificação da descarga da fibra-C broncopulmonar, que ao disparar respostas reflexas e sensoriais desencadeia uma hipersensibilidade nas vias aéreas (HSU & LEE, 2015). Todavia, até o momento, não foi determinado se o receptor TRPA1 também estaria envolvido no mecanismo pelo qual IECAs causam efeitos adversos nas vias aéreas e se o tratamento crônico com essa classe de fármacos aumentaria a sua expressão *in vivo*, o que necessita de investigação.

Ainda nesse sentido, de maneira interessante, uma degradação mais lenta de des-arginina⁹-bradicinina, um metabólito das cininas proveniente não da ação da ECA, mas sim da ação de carboxipeptidases, e que possui uma alta afinidade para os receptores B₁, tem sido observada no plasma de pacientes hipertensos que sofreram angioedema induzido por IECA, indicando que a expressão de receptores B₁ em tais doentes pode precipitar essa reação (MARCEAU & REGOLI, 2004; LEEB-LUNDBERG, et al., 2005).

Calixto et al. (2000) reportaram que o mecanismo responsável pela expressão do receptor B₁ pode ser induzido por altas concentrações de agonistas B₁ endógenos. De fato, ratos e camundongos apresentaram, durante o tratamento crônico com IECA, um aumento na expressão de receptores B₁ (SULPIZIO et al., 2004).

Além disso, a ativação de alguns receptores B₂, bem como as vias de segundo mensageiros promovidas com sua ativação, podem gerar um aumento na população do receptor B₁, sugerindo a existência de um equilíbrio entre esses dois receptores,

especialmente durante processos inflamatórios (CALIXTO et al., 2000). Conseqüentemente, não podemos descartar que a expressão de receptores B₁, possa também estar aumentada em pacientes que fazem o uso crônico de IECAs, o que poderia facilitar a ocorrência de efeitos adversos, embora também seja algo ainda não demonstrado.

Sendo assim, os resultados do presente estudo contribuem para a elucidação de um possível mecanismo pelo qual IECAs induzem efeitos adversos nas vias aéreas *in vivo*, embora o envolvimento de outros receptores não possa ser descartado.

No entanto, até o presente momento, podemos sugerir que o tratamento com captopril, incapaz de causar extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos que respiravam espontaneamente, parece induzir a sensibilização do receptor TRPV1, parcialmente, via ativação do receptor B₂, coexpressos em fibras sensoriais peptidérgicas das vias aéreas. Desse modo, a ativação de receptores B₂ causando a sensibilização e redução do limiar de ativação do canal TRPV1, poderia ocasionar sua ativação durante a ventilação mecânica a qual os animais que respiravam artificialmente foram expostos.

Na mesma direção, é possível sugerir uma nova abordagem no tratamento com captopril em pacientes que necessitem de ventilação mecânica, indicando que esse procedimento deve ser realizado com cautela em pacientes durante o tratamento com IECAs. E finalmente, sugere-se que receptores TRPV1 possam constituir alvos terapêuticos interessantes para o desenvolvimento de antagonistas seletivos e de ação local nas vias aéreas como alternativa para amenizar os efeitos adversos induzidos por IECAs.

6. CONCLUSÃO

A conclusão do presente estudo está representada esquematicamente na figura abaixo:

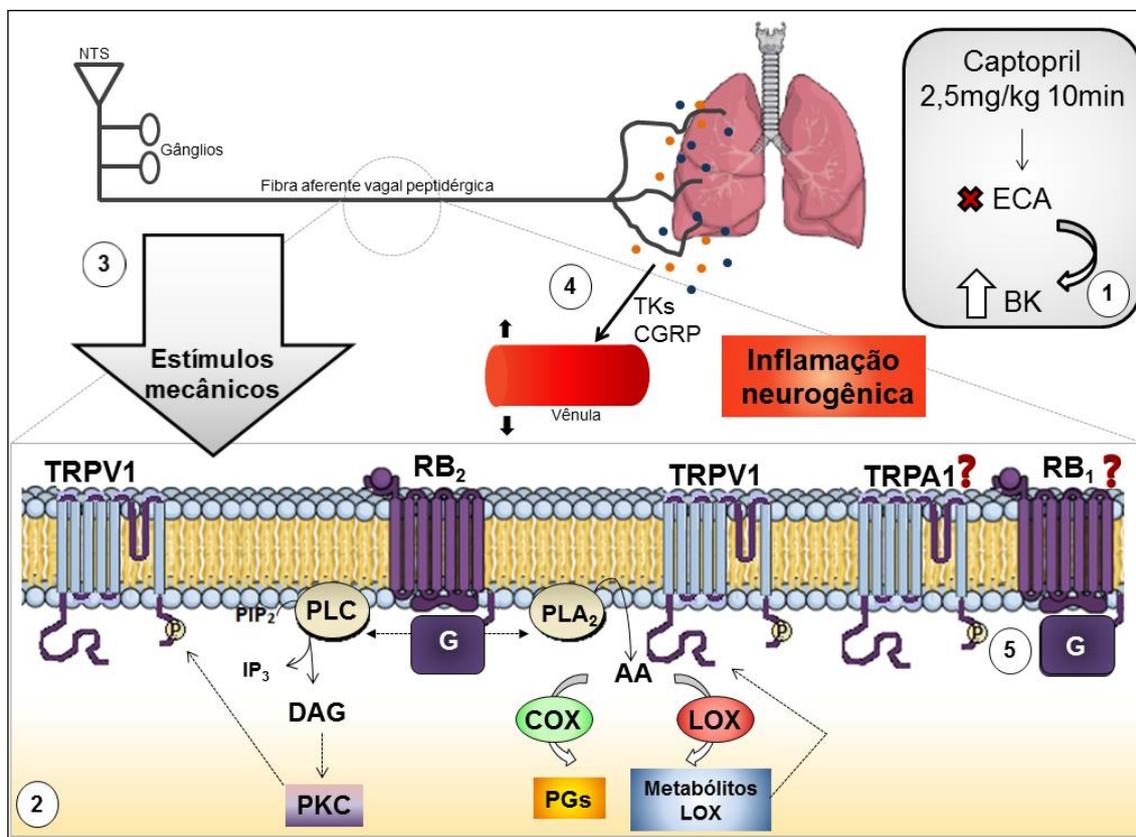


FIGURA 17: Representação esquemática do mecanismo proposto pelo qual captopril pode promover sensibilização do receptor TRPV1, pelo menos em parte, via ativação do receptor B₂ nas vias aéreas de ratos mecanicamente ventilados. O tratamento com captopril (2,5 mg/kg), após 10 minutos, possivelmente por inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA) e, conseqüentemente, o metabolismo da bradicinina (BK), promove o aumento dos níveis plasmáticos deste peptídeo vasodilatador (passo 1). A bradicinina por sua vez, ativa seus receptores metabotrópicos B₂ (RB₂) acoplados a diferentes tipos de proteína G, coexpressos com receptores TRPV1 em fibras aferentes vagais peptidérgicas, sensibilizando TRPV1 por meio de diferentes vias (RB₂-PLC-PIP₂; RB₂-PLC-DAG-PKC; RB₂-PLA₂-AA) e causando hipersensibilidade nas vias aéreas (passo 2). Após a sensibilização, canais TRPV1 podem ser ativados quando expostos a diversos estímulos, como, por exemplo, possivelmente pela ventilação mecânica (passo 3). Assim, uma vez ativados, TRPV1 poderiam participar de reflexos axonais locais que envolvem a liberação de neuropeptídeos (TKs, CGRP)

pela fibra sensorial, causando, por exemplo, extravasamento plasmático de vênulas pós-capilares, um dos sinais de inflamação neurogênica (passo 4). Em adição, até o momento, não foi determinado se os receptores TRPA1 e RB₁ também estariam envolvidos neste mecanismo (passo 5). AA, ácido araquidônico; BK, bradicinina; CGRP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; COX, cicloxigenase; DAG, diacilglicerol; ECA, enzima conversora de angiotensina; IP₃, inositol (1,4,5)-trifosfato; LOX, lipoxigenase; NTS, núcleo do trato solitário; PGs, prostaglandinas; PIP₂, fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato; PLC, fosfolipase C; PLA₂, fosfolipase A₂; PKC, proteína quinase C; RB₂, receptor de bradicinina subtipo 2; TKs, taquicinas; TRPV1, receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, W. M.; SCURI, M.; FARMER, S. G. Peptide and non-peptide bradykinin receptor antagonists: role in allergic airway disease. **Eur J Pharmacol**. v. 533, n. 1-3, p. 215-21, 2006.
- ACHARYA, K. R.; STURROCK, E. D.; RIORDAN, J. F.; EHLERS, M. R. Ace revisited: a new target for structure-based drug design. **Nat Rev Drug Discov**. v. 2, n. 11, p. 891-902, 2003.
- ADCOCK, J. J. TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. **Pulm Pharmacol Ther**. v. 22, n. 2, p. 65-70, 2009.
- ANDRÈ, E.; CAMPI, B.; MATERAZZI, S.; TREVISANI, M.; AMADESI, S.; MASSI, D.; CREMINON, C.; VAKSMAN, N.; NASSINI, R.; CIVELLI, M.; BARALDI, P.G.; et al. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. **J Clin Invest**. v. 118, n. 7, p. 2574-82, 2008.
- ARAKAWA, H.; KAWIKOVA, I.; LÖFDAHL, C.G.; LÖTVALL, J. Bradykinin-induced airway responses in guinea pig: effects of inhibition of cyclooxygenase and thromboxane synthetase. **Eur J Pharmacol**. v. 229, n. 2-3, p. 131-6, 1992.
- ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **J Manag Care Pharm**. v. 13, n. 8 Suppl B, p. 9-20, 2007.
- BALUK, P.; THURSTON, G.; MURPHY, T. J.; BUNNETT, N. W.; MCDONALD, D. M. Neurogenic plasma leakage in mouse airways. **Br J Pharmacol**. v. 126, n. 2, p. 522-8, 1999.
- BANDELL, M.; STORY, G. M.; HWANG, S. W.; VISWANATH, V.; EID, S. R.; PETRUS, M. J.; EARLEY, T. J.; et al., Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**. v. 41, p. 849-857, 2004.
- BAS, M.; GREVE, J.; STELTER, K.; BIER, H.; STARK, T.; HOFFMANN, T. K.; KOJDA, G. Therapeutic efficacy of icatibant in angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors: a case series. **Ann Emerg Med**. v. 56, n. 3, p. 278-82, 2010.
- BENEMEI, S.; PATACCHINI, R.; TREVISANI, M.; GEPPETTI, P. TRP channels. **Curr Opin Pharmacol**. v. 22, p. 18-23, 2015.
- BERNSTEIN, K. E; ONG, F. S.; BLACKWELL, W. L.; SHAH, K. H.; GIANI, J. F.; GONZALEZ-VILLALOBOS, R. A.; SHEN, X. Z.; FUCHS, S.; TOUYZ, R. M. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. **Pharmacol Rev**. v. 65, n. 1, p. 1-46, 2013.
- BISHNOI, M.; KHARE, P.; KANTHI, K.; PREMKUMAR, L. The role of TRPV1 in acquired diseases: therapeutic potential of TRPV1 modulators. In Szallasi, A. (Ed.), TRP Channels as Therapeutic Targets: From Basic Science to Clinical Use., First ed. **Academic Press**, London, p. 35-58, 2015.

- BHAVE, G.; HU, H. J.; GLAUNER, K. S.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D. J.; OXFORD, G. S.; GEREAU, R. W. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proc Natl Acad Sci**. v. 100, n. 21, p. 12480-5, 2003.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. v. 87, n. 1, p. 1-5, 2000.
- CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D. A.; CAMPOS, M. M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol**. v. 143, n. 7, p. 803-18, c 2004. ISSN 0007-1188.
- CAMPBELL, D. J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 35, n. 6, p. 784-91, 2003.
- CAMPO, P.; FERNANDEZ, T. D.; CANTO, G.; MAYORGA, C. Angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**. v. 13, n. 4, p. 337-44, 2013.
- CANNING, B. J.; SPINA, D. Sensory nerves and airway irritability. **Handb Exp Pharmacol**. n. 194, p. 139-83, 2009.
- CARR, M. J.; KOLLARIK, M.; MEEKER, S. N.; UNDEM, B. J. A role for TRPV1 in bradykinin-induced excitation of vagal airway afferent nerve terminals. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 304, p. 1275-1279, 2003.
- CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacol Ther**. v. 94, n. 1-2, p. 1-34, 2002.
- CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. v. 389, n. 6653, p. 816-24, 1997.
- CHUANG, H. H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E.; BASBAUM, A. I.; CHAO, M. V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**. v. 411, p. 957-962, 2001.
- COSTA-NETO, C. M. ; DILLENBURG-PILLA, P.; HEINRICH, T. A.; PARREIRAS-SILVA, L. T.; PEREIRA, M. G.; REIS, R. I.; SOUZA, P. P. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **Int Immunopharmacol**. v. 8, n. 2, p. 135-42, 2008.
- CUGNO, M.; AGOSTONI, P.; MARI, D.; MERONI, P. L.; GREGORINI, .L.; BUSSOTTI, M.; ANGUSSOLA, G. B.; DONATELLI, F.; NUSSBERGER, J. Impaired bradykinin response to ischaemia and exercise in patients with mild congestive heart failure during angiotensin-converting enzyme treatment. Relationships with endothelial function, coagulation and inflammation. **Br J Haematol**. v. 130, p. 113-120, 2005.
- CZIKORA, Á.; RUTKAI, I.; PÁSZTOR, E. T.; SZALAI, A.; PÓRSZÁSZ, R.; BOCZÁN, J.; ÉDES, I.; PAPP, Z.; TÓTH, A. Different desensitization patterns for sensory and vascular TRPV1 populations in the rat: expression, localization and functional consequences. **PLoS One**. v. 8, n. 11, p. e78184, 2013.

- DALY, D.; RONG, W.; CHESS-WILLIAMS, R.; CHAPPLE, C.; GRUNDY, D. Bladder afferent sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. **J Physiol.** v. 583, p. 663-674, 2007.
- EMANUELI, C.; GRADY, E. F.; MADEDDU, P.; FIGINI, M.; BUNNETT, N. W.; PARISI, D.; REGOLI, D.; GEPPETTI, P. Acute ACE inhibition causes plasma extravasation in mice that is mediated by bradykinin and substance P. **Hypertension.** v. 31, n. 6, p. 1299-304, 1998.
- FENG, N. H.; LEE, H. H.; SHIANG, J. C.; MA, M. C. Transient receptor potential vanilloid type 1 channels act as mechanoreceptors and cause substance P release and sensory activation in rat kidneys. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 294, p. 316-325, 2008.
- FERNANDES, E. S.; FERNANDES, M. A.; KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **Br J Pharmacol.** v. 166, n. 2, p. 510-21, 2012.
- FERREIRA, J.; DA SILVA, G. L.; CALIXTO, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **Br J Pharmacol.** v. 141, p. 787-794, 2004.
- FOX, A. J.; LALLOO, U. G.; BELVISI, M. G.; BERNAREGGI, M.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Bradykinin-evoked sensitization of airway sensory nerves: a mechanism for ACE-inhibitor cough. **Nat Med.** v. 2, n. 7, p. 814-7, 1996.
- FULLER, R. W.; DIXON, C. M.; CUSS, F. M.; BARNES, P. J. Bradykinin-induced bronchoconstriction in humans. Mode of action. **Am Rev Respir Dis.** v. 135, n. 1, p. 176-80, 1987.
- GAMA LANDGRAF, R.; JANCAR, S.; STEIL, A. A.; SIROIS, P. Modulation of allergic and immune complex-induced lung inflammation by bradykinin receptor antagonists. **Inflamm Res.** v. 53, n. 2, p. 78-83, 2004.
- GEPPETTI, P.; BERTRAND, C.; BAKER, J.; YAMAWAKI, I.; PIEDIMONTE, G.; NADEL, J.A. Ruthenium red, but not capsazepine reduces plasma extravasation by cigarette smoke in rat airways. **Br J Pharmacol.** v. 108, p. 646-650, 1993.
- GEPPETTI, P.; MATERAZZI, S.; NICOLETTI, P. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. **Eur J Pharmacol.** v. 533, n. 1-3, p. 207-14, 2006.
- GRACE, M.; BIRRELL, M. A.; DUBUIS, E.; MAHER, S. A.; BELVISI, M. G. Transient receptor potential channels mediate the tussive response to prostaglandin E2 and bradykinin. **Thorax.** v. 67, n. 10, p. 891-900, 2012.
- GRACE, M. S.; DUBUIS, E.; BIRRELL, M. A.; BELVISI, M. G. Pre-clinical studies in cough research: role of Transient Receptor Potential (TRP) channels. **Pulm Pharmacol Ther.** v. 26, n. 5, p. 498-507, 2013.
- GRACE, M. S.; BAXTER, M.; DUBUIS, E.; BIRRELL, M. A.; BELVISI, M. G. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. **Br J Pharmacol.** v. 171, p. 2593-2607, 2014.

- GRONEBERG, D. A.; NIIMI, A.; DINH, Q. T.; COSIO, B.; HEW, M.; FISCHER, A.; CHUNG, K. F. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 170, n. 12, p. 1276-80, 2004.
- HO, C. Y.; GU, Q.; LIN, Y. S.; LEE, L. Y. Sensitivity of vagal afferent endings to chemical irritants in the rat lung. **Respir Physiol.** v. 127, n. 2-3, p. 113-24, 2001.
- HOOVER, T.; LIPPMANN, M.; GROUZMANN, E.; MARCEAU, F.; HERSCU, P. L. Angiotensin converting enzyme inhibitor induced angio-oedema: a review of the pathophysiology and risk factors. **Clin Exp Allergy.** v. 40, n. 1, p. 50-61, 2010.
- HSU, C. C.; BIEN, M. Y.; HUANG, Y. T.; RUAN, T.; KOU, Y. R.; LIN, Y. S. N-arachidonyl dopamine sensitizes rat capsaicin-sensitive lung vagal afferents via activation of TRPV1 receptors. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 167, p. 323-332, 2009.
- HSU, C. C.; LEE, L. Y. Role of calcium ions in the positive interaction between TRPA1 and TRPV1 channels in bronchopulmonary sensory neurons. **J Appl Physiol.** v. 118, p. 1533-1543, 2015.
- HUANG, T. J.; HADDAD, E. B.; FOX, A. J.; SALMON, M.; JONES, C.; BURGESS, G.; CHUNG, K. F. et al. Contribution of bradykinin B(1) and B(2) receptors in allergen-induced bronchial hyperresponsiveness. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 160, n. 5, p. 1717-23, 1999.
- HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. **Semin Cell Dev Biol.** v. 17, p. 638-645, 2006.
- HWANG, S. W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S. Y.; KANG, C. J.; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K. H.; SUH, Y. G.; KIM, D.; OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc Natl Acad Sci.** v. 97, p. 6155-6160, 2000.
- ICHINOSE, M.; BARNES, P. J. Bradykinin-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction are mediated via a bradykinin B2 receptor. **Am Rev Respir Dis.** v. 142, n. 5, p. 1104-7, 1990.
- ICHINOSE, M.; NAKAJIMA, N.; TAKAHASHI, T.; YAMAUCHI, H.; INOUE, H.; TAKISHIMA, T. Protection against bradykinin-induced bronchoconstriction in asthmatic patients by neurokinin receptor antagonist. **Lancet.** v. 340, n. 8830, p. 1248-51, 1992.
- JANCSÓ, G.; KIRALY, E.; JANCSÓ-GÁBOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature.** v. 270, n. 5639, p. 741-3, 1977.
- JANCSÓ, G. Neurogenic inflammation in health and disease. **Elsevier.** 2009.
- JIA, Y.; LEE, L. Y. Role of TRPV receptors in respiratory diseases. **Biochim Biophys Acta.** v. 1772, n. 8, p. 915-27, 2007.

- JONES, R. C.; XU, L.; GEBHART, G. F. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. **J Neurosci.** v. 25, p. 10981-10989, 2005.
- JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 29, p. 355-84, 2013.
- KALINER, M.; BARNES, P.; KUNKEL, G.; BARANIUK, J. Neuropeptides in respiratory medicine. **Marcel Dekker**, New York, p. 693, 1994.
- KAPLAN, A. P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **J Allergy Clin Immunol.** v. 109, n. 2, p. 195-209, 2002.
- KASHUBA, E.; BAILEY, J.; ALLSUP, D.; CAWKWELL, L. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers.** v. 18, n. 4, p. 279-96, 2013.
- KATSUMATA, U.; SEKIZAWA, K.; UJIIE, Y.; SASAKI, H.; TAKISHIMA, T. Bradykinin-induced cough reflex markedly increases in patients with cough associated with captopril and enalapril. **Tohoku J Exp Med.** v. 164, n. 2, p. 103-9, 1991.
- KAUFMAN, M. B. ACE Inhibitor-Related Angioedema: Are Your Patients at Risk?. **P T.** v. 38, p. 170-172, 2013.
- KISSIN, I. Vanilloid-induced conduction analgesia: selective, dose-dependent, long-lasting, with a low level of potential neurotoxicity. **Anesth Analg.** v. 107, p. 271-281, 2008.
- KOLLARIK, M.; UNDEM, B. J. Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1-/- mice. **J Physiol.** v. 555, n. Pt 1, p. 115-23, 2004.
- LEE, L. Y.; GU, Q. Role of TRPV1 in inflammation-induced airway hypersensitivity. **Curr Opin Pharmacol.** v. 9, n. 3, p. 243-9, 2009.
- LEEB-LUNDBERG, L. M.; MARCEAU, F.; MÜLLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D. J.; ZURAW, B. L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev.** v. 57, n. 1, p. 27-77, 2005.
- LEI, Y.; ZHANG, Y.; CAO, Y.; EDVINSSON, L.; XU, C. B. Up-regulation of bradykinin receptors in rat bronchi via I kappa B kinase-mediated inflammatory signaling pathway. **Eur J Pharmacol.** v. 634, n. 1-3, p. 149-61, 2010.
- LIN, Y. J.; LIN, R. L.; RUAN, T.; KHOSRAVI, M.; LEE, L. Y. A synergistic effect of simultaneous TRPA1 and TRPV1 activations on vagal pulmonary C-fiber afferents. **J Appl Physiol.** v. 118, p. 273-281, 2014.
- LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. **Nature.** v. 302, n. 5905, p. 251-3, 1983.
- MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat Rev Drug Discov.** v. 3, n. 10, p. 845-52, 2004.

- MAURER, M.; BADER, M.; BAS, M.; BOSSI, F.; CICARDI, M.; CUGNO, M.; HOWARTH, P.; KAPLAN, A.; KOJDA, G.; LEEB-LUNDBERG, F.; LÖTVALL, J.; et al. New topics in bradykinin research. **Allergy**. v. 66, n. 11, p. 1397-406, 2011.
- MESSERLI, F. H.; NUSSBERGER, J. Vasopeptidase inhibition and angio-oedema. **Lancet**. v. 356, n. 9230, p. 608-9, 2000.
- MEOTTI, F. C.; LEMOS DE ANDRADE, E.; CALIXTO, J. B. TRP modulation by natural compounds. **Handb Exp Pharmacol**. v. 223, p. 1177-238, 2014.
- MICKLE, A. D.; SHEPHERD, A. J.; MOHAPATRA, D. P. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. **Prog Mol Biol Transl Sci**. v. 131, p. 73-118, 2015.
- MISTRY, S.; PAULE, C. C.; VARGA, A.; PHOTIOU, A.; JENES, A.; AVELINO, A.; BULUWELA, L. et al. Prolonged exposure to bradykinin and prostaglandin E2 increases TRPV1 mRNA but does not alter TRPV1 and TRPV1b protein expression in cultured rat primary sensory neurons. **Neurosci Lett**. v. 564, p. 89-93, 2014.
- MITCHELL, J. E.; CAMPBELL, A. P.; NEW, N. E.; SADOFSKY, L. R.; KASTELIK, J. A.; MULRENNAN, S. A.; COMPTON, S. J.; MORICE, A. H. Expression and characterization of the intracellular vanilloid receptor (TRPV1) in bronchi from patients with chronic cough. **Exp Lung Res**. v. 31, n. 3, p. 295-306, 2005.
- MORAN, M. M.; MCALEXANDER, M. A.; BÍRÓ, T.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**. v. 10, n. 8, p. 601-20, 2011.
- MOREAU, M. E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N. J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J Pharmacol Sci**. v. 99, n. 1, p. 6-38, 2005.
- MORI, K.; SAKAMOTO, W.; NAGASAWA, S. Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. III. Cleavage of HMW kininogen by the action of human salivary kallikrein. **J Biochem**. v. 90, n. 2, p. 503-9, 1981.
- MORIMOTO, T.; GANDHI, T. K.; FISKIO, J. M.; SEGER, A. C.; SO, J. W.; COOK, E. F.; FUKUI, T.; BATES, D. W. An evaluation of risk factors for adverse drug events associated with angiotensin-converting enzyme inhibitors. **J Eval Clin Pract**. v. 10, n. 4, p. 499-509, 2004.
- NAKAJIMA, N.; ICHINOSE, M.; TAKAHASHI, T.; YAMAUCHI, H.; IGARASHI, A.; MIURA, M.; INOUE, H.; TAKISHIMA, T.; SHIRATO, K. Bradykinin-induced airway inflammation. Contribution of sensory neuropeptides differs according to airway site. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 149, n. 3 Pt 1, p. 694-8, 1994.
- NILIOUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T.; PETERS, J. A. Transient receptor potential cation channels in disease. **Physiol Rev**. v. 87, n. 1, p. 165-217, 2007.
- NILIOUS, B.; SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. **Pharmacol Rev**. v. 66, n. 3, p. 676-814, 2014.

- O'NEILL, J.; BROCK, C.; OLESEN, A. E.; ANDRESEN, T.; NILSSON, M.; DICKENSON, A. H. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. **Pharmacol Ver.** v. 64, n. 4, p. 939-71, 2012.
- OMBONI, S.; BORGHI, C. Zofenopril and incidence of cough: a review of published and unpublished data. **Ther Clin Risk Manag.** v. 7, p. 459-71, 2011.
- OOI, S.; BALL, S. ACE inhibitors: their properties and role in hypertension. **Prescriber.** v. 8, n. 5, p. 48-61, 2007.
- PATEL, K. C.; DESHPANDE, S. S.; SHAH, G. B.; GOHIL, P. V. The role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in enalapril-induced airway hyperresponsiveness in mouse model. **Int J Pharm Sci Nanotech.** v. 6, n. 2, p. 2040-2045, 2013.
- PETHO, G.; REEH, P. W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiol Rev.** v. 92, n. 4, p. 1699-775, 2012.
- PINGLE, S. C.; MATTA, J. A.; AHERN, G. P. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. **Handb Exp Pharmacol.** n. 179, p. 155-71, 2007.
- PREMKUMAR, L. S.; AHERN, G. P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature.** v. 408, n. 6815, p. 985-90, 2000.
- PRETI, D.; SZALLASI, A.; PATAACCHINI, R. TRP channels as therapeutic targets in airway disorders: a patent review. **Expert Opin Ther Pat.** v. 22, p. 663-695, 2012.
- RADRESA, O.; BROWN, W.; LAIRD, J. TRPV1 as a Polymodal Sensor: Potential to Discover TRPV1 Antagonists Selective for Specific Activating Modalities. In Szallasi, A. (Ed.), TRP Channels in Drug Discovery. **Humana Press**, p. 221-235, 2012.
- REGOLI, D.; PLANTE, G. E.; GOBEIL, F. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. **Pharmacol Ther.** v. 135, n. 1, p. 94-111, 2012.
- REGOLI, D.; GOBEIL, F. Critical insights into the beneficial and protective actions of the kallikrein-kinin system. **Vascul Pharmacol.** v. 64, p. 1-10, 2015.
- RHALEB, N. E.; YANG, X. P.; CARRETERO, O. A. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. **Compr Physiol.** v. 1, n. 2, p. 971-93, 2011.
- ROGERIO, A. P.; ANDRADE, E. L.; CALIXTO, J. B. C-fibers, but not the transient potential receptor vanilloid 1 (TRPV1), play a role in experimental allergic airway inflammation. **Eur J Pharmacol.** v. 662, n. 1-3, p. 55-62, 2011.
- ROHACS, T.; THYAGARAJAN, B.; LUKACS, V. Phospholipase C mediated modulation of TRPV1 channels. **Mol Neurobiol.** v. 37, p. 153-163, 2008.
- SARIA, A.; LUNDBERG, J. M.; SKOFITSCH, G.; LEMBECK, F. Vascular protein linkage in various tissue induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 324, p. 212-218, 1983.

- SATO, A.; FUKUDA, S. A prospective study of frequency and characteristics of cough during ACE inhibitor treatment. **Clin Exp Hypertens**. v. 37, n. 7, p. 563-8, 2015.
- SUGIURA, T.; TOMINAGA, M.; KATSUYA, H.; MIZUMURA, K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. **J Neurophysiol**. v. 88, p. 544-8, 2002.
- SULPIZIO, A. C.; PULLEN, M. A.; EDWARDS, R. M.; BROOKS, D. P. The effect of acute angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase 24.11 inhibition on plasma extravasation in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 309, n. 3, p. 1141-7, 2004.
- SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D. N.; BLUM, C. A.; EID, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat Rev Drug Discov**. v. 6, n. 5, p. 357-72, 2007.
- TAKAHAMA, K.; Araki, T.; Fuchikami, J.; Kohjimoto, Y.; Miyata, T. Studies on the magnitude and the mechanism of cough potentiation by angiotensin-converting enzyme inhibitors in guinea-pigs: involvement of bradykinin in the potentiation. **J Pharm Pharmacol**. v. 48, n. 10, p. 1027-33, 1996.
- TAKEMURA, M.; QUARCOO, D.; NIIMI, A.; DINH, Q. T.; GEPPETTI, P.; FISCHER, A.; CHUNG, K.F.; GRONEBERG, D. A. Is TRPV1 a useful target in respiratory diseases? **Pulm Pharmacol Ther**. v. 21, p. 833-839, 2008.
- THOMAS, B. J.; WANSTALL, J. C. Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia. **Eur J Pharmacol**. v. 477, n. 2, p. 153-61, 2003.
- TOMINAGA, M.; WADA, M.; MASU, M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. **Proc Natl Acad Sci**. v. 98, n.12, p. 6951-6956, 2001.
- TRAMONTANA, M.; M, LECCI, A.; MEINI, S.; MONTSERRAT, X.; PASCUAL, J.; GIULIANI, S.; QUARTARA, L.; MAGGI, C. A. Differences between peptide and nonpeptide B(2) bradykinin receptor antagonists in blocking bronchoconstriction and hypotension induced by bradykinin in anesthetized Guinea pigs. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 296, n. 3, p. 1051-7, 2001.
- TREVISANI, M.; SMART, D.; GUNTHORPE, M. J.; TOGNETTO, M.; BARBIERI, M.; CAMPI, B.; AMADESI, S.; GRAY, J.; JERMAN, J. C.; BROUGH, S. J.; OWEN, D.; SMITH, G. D.; RANDALL, A. D.; HARRISON, S.; BIANCHI, A.; DAVIS, J. B.; GEPPETTI, P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. **Nat Neurosci**. v. 5, n. 6, p. 546-551, 2002.
- TREVISANI, M.; GAZZIERI, D.; BENVENUTI, F.; CAMPI, B.; DINH, Q. T.; GRONEBERG, D. A.; RIGONI, M.; EMONDS-ALT, X.; CREMINON, C.; FISCHER, A.; GEPPETTI, P.; et al. Ethanol causes inflammation in the airways by a neurogenic and TRPV1-dependent mechanism. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 309, n. 3, p. 1167-73, 2004.
- TREVISANI, M.; PATACCHINI, R.; NICOLETTI, P.; GATTI, R.; GAZZIERI, D.; LISSI, N.; ZAGLI, G.; CREMINON, C.; GEPPETTI, P.; HARRISON, S. Hydrogen

sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. **Br J Pharmacol**. v. 145, p. 1123-1131, 2005.

UGO BASILE. Bronchospasm Transducer. Ventilators and gas anesthesia. Disponível em: <<http://http://science.kyst.com.tw/upload/pdfs1506023945104685.pdf>>. Acesso em 4 de março de 2016.

VALENTI, C.; CIALDAI, C.; GIULIANI, S.; LECCI, A.; TRAMONTANA, M.; MEINI, S.; QUARTARA, L.; MAGGI, C. A.; MEN16132, a novel potent and selective nonpeptide kinin B2 receptor antagonist: in vivo activity on bradykinin-induced bronchoconstriction and nasal mucosa microvascular leakage in anesthetized guinea pigs. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 315, n. 2, p. 616-23, 2005.

VANE, J. R. The history of inhibitors of angiotensin converting enzyme. **J Physiol Pharmacol**. v. 50, n. 4, p. 489-98, 1999.

VASEKAR, M.; CRAIG, T. J. ACE inhibitor-induced angioedema. **Curr Allergy Asthma Rep**. v. 12, n. 1, p. 72-8, 2012.

VELDHUIS, N. A.; POOLE, D. P.; GRACE, M.; MCINTYRE, P.; BUNNETT, N. W. The G protein-coupled receptor-transient receptor potential channel axis: molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation. **Pharmacol Ver**. v. 67, n. 1, p. 36-73, 2015.

VELLANI, V.; MAPPLEBECK, S.; MORIONDO, A.; DAVIS, J. B.; MCNAUGHTON, P. A. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. **J Physiol**. v. 534, p. 813-25, 2001.

VYKLIČKÝ, L.; NOVÁKOVÁ-TOUSOVÁ, K.; BENEDIKT, J.; SAMAD, A.; TOUSKA, F.; VLACHOVÁ, V. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. **Physiol Res**. v. 57 Suppl 3, p. S59-68, 2008.

WATANABE, N.; HORIE, S.; MICHAEL, G. J.; SPINA, D.; PAGE, C. P.; PRIESTLEY, J. V. Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (trpv1) in the guinea pig respiratory system. **Pulm Pharmacol Ther**. v. 18, n. 3, p. 187-197, 2005.

WATANABE, N.; HORIE, S.; MICHAEL, G. J.; KEIR, S.; SPINA, D.; PAGE, C. P.; PRIESTLEY, J. V. Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (trpv)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. **Neuroscience**. v. 141, n. 3, p. 1533-1543, 2006.

WATANABE, N.; HORIE, S.; SPINA, D.; MICHAEL, G. J.; PAGE, C. P.; PRIESTLEY, J. V. Immunohistochemical localization of transient receptor potential vanilloid subtype 1 in the trachea of ovalbumin-sensitized guinea pigs. **Int Arch Allergy Immunol**. v. 146, n. 1, p. 28-32, 2008.

WATANABE, H.; OHBA, T.; SATOH, K.; SANO, M.; SHIOYA, T.; ITO, H. TRPV1 and TRPA1 in Pulmonary Vagal Afferents and their Relations to Airway Sensitivity. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**. v. 10, p. 18-30, 2011.

YOSHIHARA, S.; CHAN, B.; YAMAWAKI, I.; GEPPETTI, P.; RICCIARDOLO, F. L.; MASSION, P. P.; NADEL, J. A. Plasma extravasation in the rat trachea induced by cold air is mediated by tachykinin release from sensory nerves. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 151, p. 1011-1017, 1995.

ZAMAN, M. A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. **Nat Rev Drug Discov.** v. 1, n. 8, p. 621-36, 2002.