

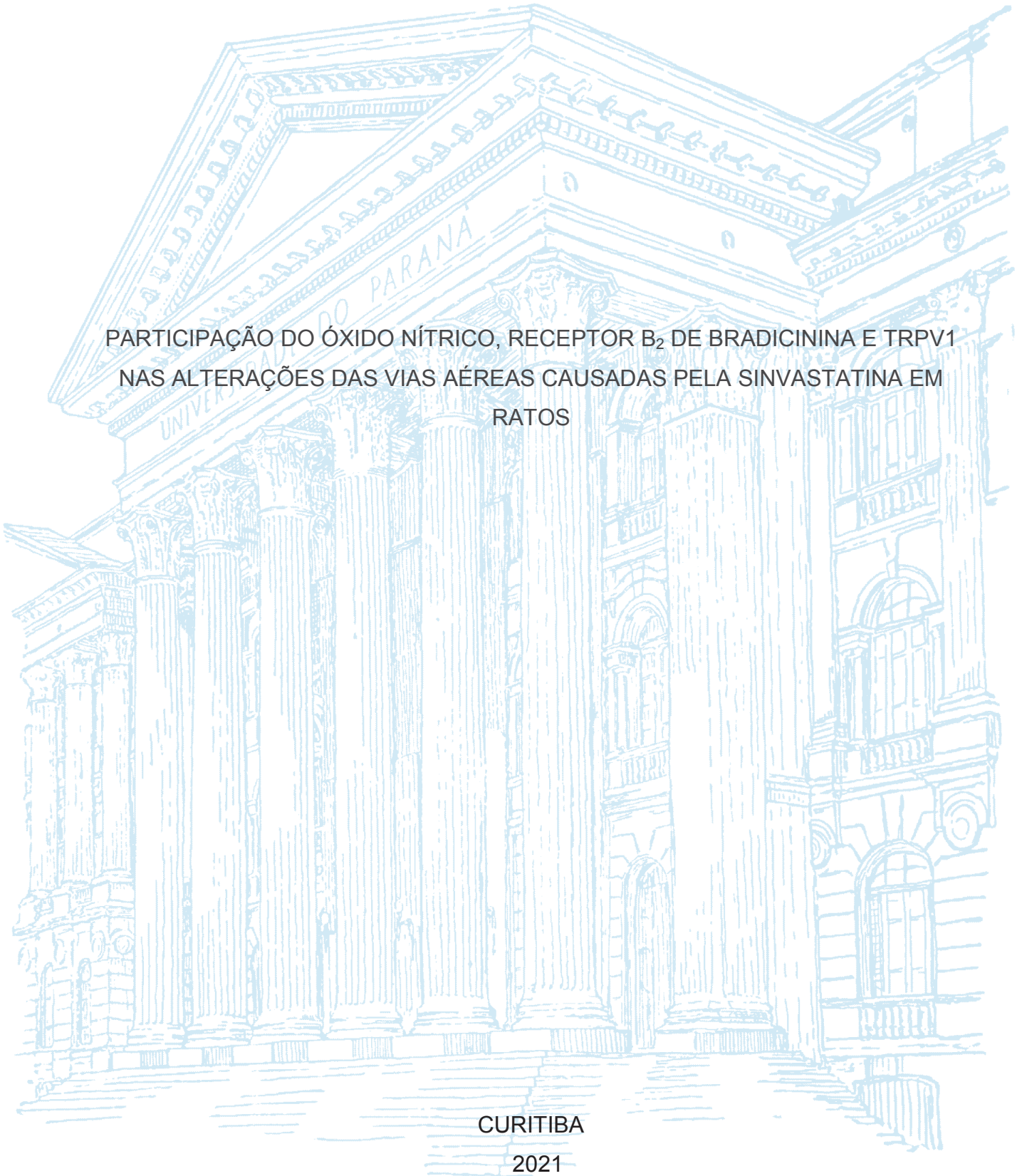
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAYARA ALVES AMORIM

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO, RECEPTOR B_2 DE BRADICININA E TRPV1
NAS ALTERAÇÕES DAS VIAS AÉREAS CAUSADAS PELA SINVASTATINA EM
RATOS

CURITIBA

2021



MAYARA ALVES AMORIM

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO, RECEPTOR B₂ DE BRADICININA E TRPV1
NAS ALTERAÇÕES DAS VIAS AÉREAS CAUSADAS PELA SINVASTATINA EM
RATOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eunice André

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Amorim, Mayara Alves.
Participação do óxido nítrico, receptor B2 de bradicinina e TRPV1 nas alterações das vias aéreas causadas pela sinvastatina em ratos. / Mayara Alves Amorim. – Curitiba, 2021.
72 f. : il.

Orientadora: Eunice André.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Bradicinina. 2. Oxido nítrico. 3. Sinvastatina. 4. Fármacos cardiovasculares. 5. Farmacologia cardiovascular. I. Título. II. André, Eunice. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.71



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
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 **MAYARA ALVES AMORIM** intitulada: **Participação do óxido nítrico, receptor B2 de bradicinina e TRPV1 nas alterações das vias aéreas causadas pela sinvastatina em ratos**, sob orientação da Profa. Dra. EUNICE ANDRÉ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica

19/04/2021 10:42:30.0

EUNICE ANDRÉ

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/04/2021 13:47:52.0

JANAÍNA MENEZES ZANOVELI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/04/2021 15:33:33.0

REGINA DE SORDI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente **a Deus**, por me dar sabedoria, força e fé em todos os momentos de minha vida e por me propiciar a realização desse sonho.

Aos meus pais Ivanir e Gilberto, por acreditarem em mim, e nunca desistirem de lutar para que eu pudesse ter um bom estudo. Sempre foram presentes em minha vida, e tudo que sei e sou, é devido aos ensinamentos que eles me transmitiram durante toda minha trajetória.

À minha orientadora e mãe científica, Dra. Eunice André, que me acolheu e desde sempre esteve muito presente, me ajudando, ensinando e transmitindo todo seu conhecimento, expresse minha enorme admiração e gratidão.

À Janiana, que foi a luz em todo o meu percurso, sempre disposta a me ensinar com muito carinho, dedicação e paciência. Ao Vitor, Larissa e Nicolly que foram meus colegas de laboratório, me ensinaram muito durante esses dois anos.

À Débora e a Juliana que não só me deram suporte, mas como também se tornaram grandes amigas. Agradeço por todo apoio, amizade e companheirismo.

A todos os integrantes do laboratório de pele que foram grandes amigos que fizeram parte da minha jornada e me acolheram em seu laboratório.

À toda minha família e amigos, especialmente a Karolyne, Letícia e Samara que sempre me apoiaram e sempre foram presentes e mostraram o verdadeiro significado da palavra amizade.

À Dra. Juliana Chichorro, Dra. Joice da Cunha e Dra. Alexandra Acco, que são grandes exemplos de professoras, que fizeram parte da minha trajetória, transmitindo seus conhecimentos.

Ao pessoal do biotério, que sempre foram muito atenciosos comigo. E aos animais que infelizmente fazem parte das pesquisas, sem eles não seria possível à realização desse estudo.

À banca por ter aceitado examinar meu projeto. À Universidade Federal do Paraná, ao Departamento de Farmacologia, a todos os professores do programa e a CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Por fim, a todos que diretamente e indiretamente fizeram parte e contribuíram para a realização desse trabalho.

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.”

- **Albert Einstein**

RESUMO

As estatinas são as principais classes de fármacos para a prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares. Baseado nisso é de extrema importância o conhecimento dos efeitos adversos relacionados ao uso desse fármaco. Tosse seca tem sido relatada em pacientes que recebem terapia com estatinas; no entanto, o mecanismo deste efeito adverso é desconhecido. O objetivo deste estudo foi analisar o papel do óxido nítrico (NO), do receptor B₂ de bradicinina e TRPV1 nas alterações das vias aéreas induzidas pela sinvastatina em ratos. Usando métodos para detectar alterações na resistência das vias aéreas e extravasamento plasmático, nós demonstramos que a sinvastatina (20 mg/kg, intravenoso, i.v.) causou extravasamento plasmático na traqueia (79,8 ± 14,8 µg/g) e brônquios (73,3 ± 8,8 µg/g) de ratos, comparado aos veículos (34,2 ± 3,6 µg/g e 29,3 ± 5,3 µg/g de tecido, respectivamente). L-NAME (30 mg/kg, intraperitoneal), o inibidor de óxido nítrico sintase, HOE 140 (10 nmol/50µl, intratraqueal), o antagonista do receptor de bradicinina B₂ e capsazepina (100 nmol/50 µl, intratraqueal) o antagonista de TRPV1, atenuaram o extravasamento plasmático induzido por sinvastatina na traqueia e brônquios de ratos. Sinvastatina (5, 10 e 20 mg/kg, i.v.) não causou broncoconstrição *per se*, mas exacerbou a resposta broncoconstritora á bradicinina (30 nmol/kg, i.v.) o agonista B₂ (0,7 ± 0,1 ml/H₂O) ou capsaicina (30 nmol/kg, i.v.), agonista do TRPV1 (0,8 ± 0,1 ml/H₂O), comparado com o veículo (0,1 ± 0,04 ml/H₂O e 0,04 ± 0,01 ml/H₂O, respectivamente). A broncoconstrição provocada por bradicinina (100 nmol/kg, i.v.) em ratos não tratados com sinvastatina, foi inibida pelo L-NAME. A exacerbação da broncoconstrição induzida por bradicinina ou capsaicina em ratos tratados com sinvastatina também foi inibida por L-NAME, HOE 140 ou capsazepina. Esses achados sugerem uma possível relação entre NO, bradicinina B₂ e TRPV1 e os efeitos da sinvastatina nas vias aéreas de ratos e poderia explicar, em parte, porque alguns pacientes relatam tosse seca após o tratamento com estatinas.

Palavras-chave: Bradicinina; tosse seca; óxido nítrico; sinvastatina; TRPV1.

ABSTRACT

Statins are the main classes of drugs for the primary and secondary prevention of cardiovascular diseases. Based on this, it is extremely important to know the adverse effects related to the use of this drug. Dry cough has been reported in patients receiving statin therapy; however, the mechanism of this adverse effect is unknown. The objective of this study was to analyse the role of nitric oxide (NO), bradykinin B₂ receptor, and TRPV1 in airways alterations induced by simvastatin in rats. Using methods to detect alterations in airway resistance and plasma extravasation, we demonstrated that simvastatin (20 mg/kg, intravenous, i.v.) caused plasma extravasation in the trachea ($79.8 \pm 14.8 \mu\text{g/g/tissue}$) and bronchi ($73.3 \pm 8.8 \mu\text{g/g/tissue}$) of rats, compared to the vehicle ($34.2 \pm 3.6 \mu\text{g/g}$ and $29.3 \pm 5.3 \mu\text{g/g}$ of tissue, respectively). L-NAME (30 mg/kg, intraperitoneal), an NO synthase inhibitor, HOE 140 (10 nmol/50 μl , intratracheal), a bradykinin B₂ antagonist, and capsazepine (100 nmol/50 μl , intratracheal), a TRPV1 antagonist, attenuated simvastatin-induced plasma extravasation in the trachea and bronchi of rats. Simvastatin (5, 10 and 20 mg/kg) did not cause bronchoconstriction *per se*, but exacerbated the bronchoconstrictive response to bradykinin (30 nmol/kg, i.v.) a B₂ agonist ($0.7 \pm 0.1 \text{ ml/H}_2\text{O}$) or capsaicin (30 nmol/kg, i.v.), a TRPV1 agonist ($0.8 \pm 0.1 \text{ ml/H}_2\text{O}$), compared to the vehicle ($0.1 \pm 0.04 \text{ ml/H}_2\text{O}$ and $0.04 \pm 0.01 \text{ ml/H}_2\text{O}$, respectively). The bronchoconstriction elicited by bradykinin (100 nmol/kg, i.v.) in simvastatin non-treated rats was inhibited by L-NAME. The exacerbation of bronchoconstriction induced by bradykinin or capsaicin in simvastatin-treated rats was also inhibited by L-NAME, HOE 140, or capsazepine. These findings suggest a possible relationship between NO, bradykinin B₂, and TRPV1 and the effects of simvastatin in rat airways and could explain, in part, why some patients report dry cough after treatment with statins.

Keywords: Bradykinin, dry cough, nitric oxide, simvastatin, TRPV1.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática do processo de inflamação neurogênica, e o aparecimento de broncoconstrição e tosse mediada pelo receptor TRPV1 nas vias aéreas.....	25
FIGURA 2 – Desenho esquemático do procedimento de ventilação mecânica e artificial em ratos.....	31
FIGURA 3 – Representação esquemática do protocolo 4.2.3.....	33
FIGURA 4 – Representação esquemática do protocolo 4.2.4.....	34
FIGURA 5 – Representação esquemática do protocolo 4.2.5.....	35
FIGURA 6 – Representação esquemática do protocolo 4.2.6.....	36
FIGURA 7 – Representação esquemática do protocolo 4.2.7.....	37
FIGURA 8 – Representação esquemática do protocolo 4.2.8.....	38
FIGURA 9 – Representação esquemática do protocolo 4.2.9.....	39
FIGURA 10 – Curva dose-resposta para o extravasamento plasmático causado pelo tratamento intravenoso com sinvastatina na traqueia e brônquios de ratos sob ventilação mecânica.....	40
FIGURA 11 – Efeito do pré-tratamento intraperitoneal na traqueia e brônquios utilizando o inibidor da NOS no extravasamento plasmático induzido por sinvastatina em ratos com ventilação mecânica.....	41
FIGURA 12 – Efeito do pré-tratamento intratraqueal na traqueia e brônquios utilizando o antagonista do receptor B ₂ no extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina em ratos com ventilação mecânica.....	42
FIGURA 13 – Efeito do pré-tratamento intratraqueal na traqueia e brônquios utilizando o antagonista do receptor TRPV1 no extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina em ratos com ventilação mecânica.....	43
FIGURA 14 – Efeito do aumento da resposta broncoconstritora para bradicinina e capsaicina nas vias aéreas de ratos tratados com sinvastatina.....	45

FIGURA 15 – Efeito do pré-tratamento intraperitoneal com o inibidor da NOS na broncoconstrição induzida por bradicinina em ratos tratados e não tratados com sinvastatina.....47

FIGURA 16 – Efeito do pré-tratamento intratraqueal com o antagonista do receptor B₂, e TRPV1 na broncoconstrição induzida por bradicinina em ratos tratados com sinvastatina.....49

FIGURA 17 – Efeito do pré-tratamento intraperitoneal com o inibidor da NOS e intratraqueal com antagonista do receptor B₂ ou antagonista do receptor TRPV1 na broncoconstrição aumentada pela capsaicina em ratos tratados com sinvastatina.....51

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AMPk	- Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	- Análise de variância
ATP	- Adenosina trifosfato
B ₁	- Receptor de bradicinina subtipo 1
B ₂	- Receptor de bradicinina subtipo 1
BH4	- Tetraidrobiopterina
BK	- Bradicinina
Ca ²⁺	- Íons cálcio
CAMKII	- Proteínas quinase dependentes de Ca ²⁺ /calmodulina do tipo II
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-2	- Ciclooxygenase-2
CPZ	- Capsazepina
CYP 450	- Citocromo 450
CYP2C9	- Citocromo P450 2C9
CYP3A4	- Citocromo P450 3A4
DAG	- Diacilglicerol
DCA	- Doenças cardiovasculares ateroscleróticas
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPI	- Doença pulmonar intersticial
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
EUA	- Estados Unidos da América
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
e.p.m	- Erro padrão da média
et al.	- E outros
FAD	- Flavina adenina dinucleótidos
FIG	- Figura
FMN	- Flavina mononucleotídeo
FRDE	- Fator de relaxamento derivado do endotélio
GMPc	- Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	- Receptor acoplado a proteína G

GRD	- Gânglio da raiz dorsal
12-HPETE	- 12-hidroxeicosatetraenóico
15-HPETE	- 15-hidroxeicosatetraenóico
H ₂ O	- Água
HDL	- Lipoproteínas de alta densidade
HMG-CoA	- 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HOE	- Hoe 140
IECAs	- Inibidores da enzima conversora de angiotensina
INANC	- Inibitório do sistema nervoso não adrenérgico e não colinérgico
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	- Inositol (1,4,5)-trifosfato
i.p.	- Intraperitoneal
i.t.	- Intratraqueal
i.v.	- Intravenoso
LDL	- Lipoproteínas de baixa densidade
L-NAME	- NG-nitro-L-arginina metil éster
LTB ₄	- Leucotrieno B ₄
LOX	- Lipoxigenase
LXRs	- Receptores X presentes no fígado
LXR α	- Receptor X α presente no fígado
mRNA	- RNA mensageiro
Na ⁺	- Íons sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAPQI	- N-acetil-p-benzoquinoneimina
NK1	- Receptor de taquicinina subtipo 1
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NOS1	- Óxido nítrico sintase neuronal
NOS2	- Óxido nítrico sintase induzível
NOS3	- Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NTS	- Núcleo do trato solitário
PEEP	- Pressão expiratória final positiva

pH	- Potencial hidrogeniônico
PG	- Prostaglandina
PGD2	- Prostaglandina D ₂
PGE2	- Prostaglandina E ₂
PKA	- Proteína quinase A
PKC	- Proteína quinase C
PKG	- Proteína quinase G
RTX	- Resiniferotoxina
SNC	- Sistema Nervoso Central
SP	- Substância P
TG	- Gânglio trigêmeinal
TGs	- Triglicerídeos
TRP	- Receptor de potencial transitório
TRPs	- Receptores de potencial transitório
TRPA	- Receptor de potencial transitório anquirina
TRPA1	- Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPC	- Receptor de potencial transitório clássico ou canônico
TRPM	- Receptor de potencial transitório melastatina
TRPML	- Receptor de potencial transitório mucolipina
TRPN	- Receptor de potencial transitório potencial C do Mecanorreceptor
TRPP	- Receptor de potencial transitório policistina
TRPV	- Receptor de potencial transitório vanilóide
TRPV1	- Receptor de potencial transitório vanilóide 1
Vei	- Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	INIBIDORES DA HMG-COA REDUTASE - ESTATINAS	16
1.2	ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NAS VIAS AÉREAS.....	19
1.3	ENVOLVIMENTO DA BRADICININA E SEU RECEPTOR B ₂ NAS VIAS AÉREAS.....	21
1.4	RECEPTORES TRPS - TRPV1.....	22
1.5	RECEPTORES TRPV1 NAS VIAS AÉREAS.....	24
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAIS	30
4.1.1	Animais.....	30
4.1.2	Drogas e Reagentes.....	30
4.2	MÉTODOS.....	31
4.2.1	Procedimento de ventilação mecânica e artificial em ratos	31
4.2.2	Azul de Evans como marcador	31
4.2.3	Indução de extravasamento plasmático pela sinvastatina na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados	32
4.2.4	Efeito do inibidor da NOS e antagonistas dos receptores B ₂ de bradicinina e TRPV1 no extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente	33
4.2.5	Broncoconstrição induzida pela sinvastatina nas vias aéreas de ratos artificialmente ventilados	34
4.2.6	Broncoconstrição induzida pela bradicinina e capsaicina em ratos tratados com sinvastatina.....	35
4.2.7	Efeito do inibidor da NOS na broncoconstrição induzida por altas doses de bradicinina em animais não tratados com sinvastatina	36
4.2.8	Efeito do inibidor da NOS, dos antagonistas do receptor B ₂ e TRPV1 na broncoconstrição induzida por bradicinina em animais tratados com sinvastatina....	37

4.2.9	Efeito do inibidor da NOS e dos antagonistas do receptor B ₂ e TRPV1 na broncoconstrição induzida por capsaicina em animais tratados com sinvastatina	38
4.2.10	Análise Estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	EFEITO DA SINVASTATINA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS VENTILADOS ARTIFICIALMENTE.....	40
5.2	EFEITO DO INIBIDOR DA NOS NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA SINVASTATINA NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS VENTILADOS ARTIFICIALMENTE	41
5.3	EFEITO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR B ₂ DE BRADICININA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA SINVASTATINA NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS VENTILADOS ARTIFICIALMENTE.....	42
5.4	EFEITO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR TRPV1 NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA SINVASTATINA NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS VENTILADOS ARTIFICIALMENTE.....	43
5.5	AUMENTO DA RESPOSTA BRONCOCONSTRIÇÃO PARA A BRADICININA OU CAPSAICINA EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA..	44
5.6	EFEITO DO INIBIDOR DA NOS NO AUMENTO DA RESPOSTA BRONCOCONSTRIÇÃO INDUZIDA PELA BRADICININA EM RATOS NÃO TRATADOS E TRATADOS COM SINVASTATINA.....	46
5.7	EFEITO DOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR B ₂ E TRPV1 NO AUMENTO DA RESPOSTA BRONCOCONSTRIÇÃO INDUZIDA PELA BRADICININA EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA	48
5.8	EFEITO DO INIBIDOR DA NOS, DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR B ₂ E DO TRPV1 NO AUMENTO DA RESPOSTA BRONCOCONSTRIÇÃO INDUZIDA PELA CAPSAICINA EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 INIBIDORES DA HMG-COA REDUTASE - ESTATINAS

Doenças cardiovasculares ateroscleróticas (DCA) são uma das principais causas de mortalidade no mundo. Nos Estados Unidos da América (EUA) quase um terço da população morrerá de ataque cardíaco e derrame associado à DCA (ADHYARU & JACOBSON, 2015). A aterosclerose é a principal causa de doença cardiovascular e pode ser definida como uma doença inflamatória das artérias associadas a alterações lipídicas e outras alterações metabólicas (BARQUERA et al., 2015).

A dislipidemia também conhecida como hiperlipidemia é caracterizada pela elevada concentração de colesterol (≥ 200 mg/dL) na corrente sanguínea, podendo ocorrer pelo aumento dos níveis de triglicérides (TGs ≥ 150 mg/dL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL ≥ 130 mg/dL), pela diminuição dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL < 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres) ou pela associação destes. Essa disfunção é um importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose ocasionando o aparecimento de patologias cardiovasculares como infarte do miocárdio, trombooses, anginas, acidentes vasculares isquêmicos e falência cardíaca (ANDERSON et al., 2015; LIU & LI, 2015; PEREIRA et al., 2013; PU et al., 2015, RANG et al., 2016, ERRICO et al., 2013).

O principal tratamento para redução de lipídeo plasmático é a intervenção no estilo de vida seguida de terapia medicamentosa, sendo o uso de inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase também descrito na literatura como estatinas, a principal abordagem farmacológica capaz de baixar o colesterol e prevenir riscos de doenças cardiovasculares (RANG et al., 2016; ANDERSON et al., 2015).

As estatinas são uma classe de fármacos diferenciadas em dois tipos de acordo com sua obtenção, tipo I derivadas de fungos como a lovastatina, pravastatina e sinvastatina ou tipo II derivadas sinteticamente como fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina (MCFARLAND et al., 2014; STANCU & SIMA, 2001).

Através da inibição da HMG-CoA redutase, as estatinas acabam por impedir a produção endógena de colesterol, pois a enzima HMG-CoA redutase é a etapa limitante na síntese de colesterol onde catalisa a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico produzindo moléculas de colesterol nos hepatócitos, que pode desencadear uma regulação positiva da expressão do receptor de LDL, causando a sua captação da circulação sistêmica e diminuindo, portanto sua depuração no plasma. Seu mecanismo secundário consiste em diminuir níveis de colesterol total, triglicerídeos e aumentar os níveis de HDL (MCFARLAND et al., 2014; RANG et al., 2016).

Estatinas são administradas por via oral tendo o fígado como órgão alvo e apresentam boa absorção pelo intestino mesmo com metabolismo de primeira passagem. No processo de distribuição as estatinas podem se ligar a proteínas plasmáticas como albumina de forma variável podendo ser inativadas alterando o volume de distribuição e o tempo de meia vida. A via de metabolismo ocorre pelo complexo enzimático citocromo P450 (CYP450), onde a fluvastatina é metabolizada pela isoformas da enzima do citocromo P450 2C9 (CYP2C9), e a atorvastatina, lovastatina e sinvastatina pela isoformas do citocromo P450 3A4 (CYP3A4) (MCFARLAND et al., 2014; STANCU & SIMA, 2001).

O principal efeito do uso de estatinas se aplica ao mecanismo de redução lipídica no tratamento de dislipidemias e redução de risco em doenças cardiovasculares ateroscleróticas. Porém seu uso também é atribuído aos efeitos pleiotrópicos associados à melhora da função endotelial, redução de inflamação vascular, redução de agregação plaquetária, neovascularização, aumento de células progenitoras endoteliais, efeitos antitrombóticos, aumento de fibrinólise, imunossupressão, proteção contra sepse além de apresentar efeitos em processos inflamatórios, processos de coagulação e inibição do crescimento e proliferação de células tumorais sendo estudadas por muitos pesquisadores para o tratamento quimioterápico do câncer (RANG et al., 2016; STANCU & SIMA, 2001).

A terapia utilizando inibidores HMG-CoA redutase é geralmente bem tolerada, porém podem causar como efeitos adversos: toxicidade hepática, dores musculares causando mialgias, miopatias, miosite que quando grave ocasiona rabdomiólise podendo levar a insuficiência renal, doenças pulmonares intersticiais (DPI), angioedemas, problemas neurológicos. Pois as estatinas são fármacos lipossolúveis capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, logo o risco residual é

consideráveis e vários desses efeitos colaterais e letais podem ocorrer em alguns pacientes (CEBOVA et al., 2018; STANCU & SIMA, 2001).

Outro efeito indesejável que pode estar associado ao uso de estatinas é a presença de tosse sem apresentar lesão pulmonar em pacientes que administraram fármacos como rosuvastatina, atorvastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, lovastatina e pitavastatina. Um estudo realizado por Carnovale em 2014, através do uso de banco dados da Austrália, Canadá e EUA fora realizado com análise de 995 casos espontâneos de tosses induzidas por estatinas. A presença de tosse foi associada principalmente à atorvastatina, rosuvastatina e sinvastatina (CARNOVALE et al., 2014).

Pascual et al., (2008) também relataram que 11 de 12 pacientes em terapia com estatinas apresentaram tosse, que melhorou após a interrupção do tratamento com estatinas. Da mesma forma, Psaila et al., (2012) descreveram em relato de casos, tosse seca persistente dois meses após o início do uso de estatinas (sinvastatina e fluvastatina), com resolução dos sintomas após a substituição por placebo (PASCUAL CRUZ et al., 2008; PSAILA et al., 2012).

Deste modo, são necessários estudos que evidenciem o provável mecanismo por trás dos eventos adversos com a utilização dessa classe de fármacos. E assim, o entendimento dos efeitos e interações, bem como seu mecanismo causando efeitos adversos, se torna extremamente relevante para sua utilização na clínica, apresentando proeminentes implicações no tratamento dos pacientes com a utilização das estatinas (PSAILA et al., 2012).

Dentre essas estatinas citadas acima, a sinvastatina é derivada sinteticamente de um produto de fermentação de *Aspergillus terreus*, é uma lactona inativa, hidrolisada no β -hidroxiácido (metabólito ativo), absorvida após a administração por via oral e apresenta ampla extração hepática de primeira passagem, é metabolizada no fígado pelas enzimas CYP3A4 e excretada principalmente pela urina e fezes e apresenta meia vida plasmática de 1 a 2 horas. A sinvastatina é amplamente conhecida, distribuída, de fácil acesso e baixo custo em todo o mercado mundial, sendo, portanto o fármaco de escolha para esse estudo (RANG et al., 2016).

1.2 ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NAS VIAS AÉREAS

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa que pode ser formada na atmosfera por fenômenos naturais e por poluentes com consequências biológicas de longo alcance, e também pode apresentar importante forma fisiológica nos organismos vivos compreendendo desde atividades no sistema imunológico, até controle de pressão sanguínea, coagulação do sangue, além de atuar com um importante papel no processo de neurotransmissão (ROBBINS & GRISHAM, 1997; RANG et al., 2016).

Descoberta em 1987, pelos pesquisadores Furchgott & Zawadzki que estudavam o fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE), quando notaram que o vasodilatador endógeno produzido pelos vasos sanguíneos capaz de causar esse efeito via o FRDE era na verdade a molécula gasosa que conhecemos hoje como NO (VANNI et al., 2007; BOUCHER et al., 1999; RANG et al., 2016).

Esta por sua vez, é considerada hoje em dia como uma molécula relativamente instável, um radical livre, extremamente reativo, altamente lipofílico, podendo se difundir livremente além de apresentar uma meia-vida muito curta após ser liberada na corrente sanguínea (ROBBINS & GRISHAM, 1997; BOUCHER et al., 1999).

Pode ser sintetizada por uma família de enzimas conhecidas como NO sintase (NOS), presente em diversos tipos celulares apresentando isoformas: neuronal (nNOS ou NOS1), induzível (iNOS ou NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3). As isoformas nNOS e eNOS são constitutivas e regulam a homeostase fisiológica, já iNOS pode atuar produzindo grandes quantidades de NO podendo ser desde ações benéficas como ações antiparasitárias, antifúngicas e antibacterianas até ações prejudiciais ao organismo como efeitos pró-inflamatórios, choque com endotoxinas e apoptose (VANNI et al., 2007; RANG et al., 2016; HORI et al., 2011).

Sua biossíntese consiste na ação das enzimas NOS catalisando a formação de L-citrulina e NO pela molécula L-arginina, utilizando de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e moléculas de oxigênio, além de co-substratos como flavina adenina dinucleotídeos (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), tetraidrobiopterina (BH4) heme, Ca^{2+} /calmodulina e zinco (VANNI et al., 2007; RANG et al., 2016).

Essa simples molécula apresenta diversos papéis fisiológicos. Medeia comunicação entre células adjacentes e sinais dentro das células. Além disso, está envolvido em diversos sistemas como o cardiovascular, imunológico, neurológico e até mesmo o respiratório (STAR, 1993; LOWENSTEIN et al., 1994; SEABRA & DURAN, 2017).

Nas vias aéreas, esse mediador é liberado de forma endógena pela NOS, produzido por uma variedade de tipos celulares como células epiteliais, células inflamatórias, nervos das vias aéreas e células endoteliais vasculares. Além disso, o local de liberação do NO e isoforma da enzima NOS envolvida, taxa de produção e tempo de sua liberação influenciam diretamente na sua atividade fisiológica (HOBBS & IGNARRO, 1996; ANTOSOVA et al., 2017).

Antosova et al., (2017), descreve os efeitos do NO em relação ao sistema respiratório, onde este pode agir como neurotransmissor (inibitório do sistema nervoso não adrenérgico e não colinérgico, iNANC), broncodilatador, produção de surfactante, secreção de muco, estimulação da motilidade ciliar, além de apresentar efeitos anti-inflamatórios. Em resumo, seus efeitos podem ser mediados de forma dependente ou independente pela via monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (ANTOSOVA et al., 2017).

Adicionalmente, nas vias respiratórias o NO está envolvido em diversas patologias como discinesia ciliar primária, síndrome Young, sinusite, rinite alérgica, fibrose cística, asma e na sensibilidade aumentada do reflexo da tosse (MANISCALCO et al., 2007; HORI et al., 2011). Nos casos de tosse crônica, foi relatado que o NO aumenta o reflexo da tosse induzida pela capsaicina inalada associado ao processo inflamatório eosinofílico das vias aéreas, como nos eventos de tosse atípica e bronquite eosinofílica não asmática (HORI et al., 2011; BRIGHTLING et al., 2003). Além disso, a medição de NO exalado também é um teste utilizado para diagnóstico de tosse crônica, onde o seu aumento indica uma resposta favorável aos corticosteroides inalados (LIM, 2010).

O papel do NO pode estar envolvido também na modulação de receptores das vias aéreas como em efeitos broncoconstritores associados à ativação de bradicinina pelos receptores B₂ e agonistas de taquicininas pelo receptor NK1 (RICCIARDOLO et al., 2000). A participação de NO também já fora descrito na modulação de receptores que também estão envolvidos com patologias das vias

aéreas como é o caso do receptor de potencial transitório do tipo V1 (TRPV1) (MIYAMOTO et al., 2009; ZHAO et al., 2016).

Portanto, o papel fisiológico de NO nas vias aéreas envolve desde sua ação como modulador endógeno até como um mediador pró-inflamatório e imunomodulador em casos fisiopatológicos (RICCIARDOLO, 2003).

Além disso, as estatinas apresentam diversos efeitos pleiotrópicos que ocorrem devido à produção e biodisponibilidade de NO (DAVIGNON & GANZ, 2004; SUN et al., 2006b). No entanto, se as alterações das vias aéreas causadas pelas estatinas envolvem a participação de NO, ainda não foi avaliada.

1.3 ENVOLVIMENTO DA BRADICININA E SEU RECEPTOR B₂ NAS VIAS AÉREAS

Bradicinina (BK) é um peptídeo liberado dos mastócitos e basófilos a partir de um dano tecidual (DRAY & PERKINS, 1993; RAIDOO & BHOOLA, 1998; CESARE et al., 1999).

Apresenta ação inflamatória decorrente da sensibilização de seus receptores, conhecidos como receptores B₁ de bradicinina (expresso em condições inflamatórias crônicas) e receptores B₂ de bradicinina (expresso de forma constitutiva). Esses receptores são caracterizados como metabotrópicos e são capazes de sinalizar segundos mensageiros (MIZUMURA et al., 2009; MATHIVANAN et al., 2016).

A bradicinina é descrita como um mediador pró-inflamatório, apresenta um papel importante em doenças obstrutivas das vias aéreas, sendo um potente mediador capaz de causar broncoconstrição, em animais e humanos. Esse mediador inflamatório está associado a doenças inflamatórias agudas e crônicas do trato respiratório (HEWITT et al., 2016; JOSEPH & KAPLAN, 2005; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; KAPLAN & JOSEPH, 2014).

Os receptores B₁ podem ser associados às doenças respiratórias, porém a bradicinina apresenta pouca afinidade por esses receptores (NAKAJIMA et al., 1994; ABRAHAM et al., 2006; BROADLEYM et al., 2010). Seu efeito decorre principalmente, através da ativação do receptor B₂ expresso constitutivamente nos brônquios, vasos pulmonares, células epiteliais, músculo liso das vias aéreas, glândulas submucosas e nervos (MAURER et al., 2011; RICCIARDOLO et al., 2018).

Sua ação decorre da capacidade de contração do músculo liso das vias aéreas, capaz de promover extravasamento microvascular, secreção de muco, além de ativar nervos sensoriais, liberando neuropeptídeos e causando broncoconstrição reflexa, tosse e inflamação neurogênica (BARNES, 1992).

Já foi demonstrado o envolvimento da bradicinina no aparecimento da tosse seca, no qual ocorre uma indução ou sensibilização do reflexo à tosse com o tratamento de fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs), efeito este que pode ser bloqueado com o pré-tratamento de antagonistas do receptor B₂ (AL-SHAMLAN & EL-HASHIM, 2019).

Além disso, AL-SHAMLAN & EL-HASHIM (2019), demonstraram que a administração central de bradicinina pode causar reflexo de tosse, além de ocasionar a obstrução das vias aéreas por meio da ativação dependente de receptores B₂, TRPV1 e receptores de potencial transitório A1 (TRPA1) através de metabolitos produzidos pelo ácido araquidônico, corroborando, portanto, que a bradicinina tem um papel importante na sensibilização central de respostas das vias respiratórias como tosse além de apresentar envolvimento com outros receptores como receptores de potencial transitório (AL-SHAMLAN & EL-HASHIM, 2019).

1.4 RECEPTORES TRPs - TRPV1

Receptores de potencial transitório (TRPs) consistem em uma grande família de canais iônicos controlados por ligante, descobertos no ano de 1969 por Cosen e Manning que encontraram uma variedade mutante de *Drosophila melanogaster* (COSENS & MANNING, 1969).

Esses pesquisadores descobriram que essas moscas ficavam cegas quando era exposta a luz constante e intensa. Análises de eletroretinograma demonstraram que essas moscas que apresentavam essas mutações também tinham uma resposta transitória ao estímulo luminoso, enquanto as moscas que apresentavam fenótipo normal exibiam uma resposta contínua (MINKE, 2010).

Anos mais tarde o gene do receptor de potencial transitório (TRP) foi clonado e então mostrou codificar um canal de cátion permeável ao Ca²⁺ (MINKE, 2010; MONTELL, 2011; HARDIE, 2011). Em 1995 foi descoberto o primeiro homólogo TRP

em mamíferos, iniciando nesse momento a busca por genes relacionados a esses receptores, resultando na identificação de mais de 50 canais TRPs em diversos organismos além de mamíferos como vermes, insetos, leveduras e até mesmo peixes (CLAPHAM, 2003; VOETS et al., 2005; BATISTA, 2010).

Até o momento apenas sete famílias foram descritas sendo elas: TRPA (anquirina), TRPC (clássico ou canônico), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina), TRPN (potencial C do mecanorreceptor) TRPV (vanilóide) (JARA-OSEGUERA et al., 2010). Todos são formados por canais de cátions polimodais, não seletivos que são capazes de abrir em respostas a variação de temperatura, pH, osmolaridade, mediadores pró-inflamatórios, ligação de moléculas endógenas e exógenas e outras alterações na proteína que formam o canal. Esses canais estão amplamente expresso em diversas células como neurônios, pele, células tronco mesenquimais, células vasculares, fibroblastos, células imunes, e outros (HOLZER & IZZO, 2014, GHONEUM et al., 2018).

Os receptores TRPV1 são considerados termossensores e integradores moleculares para vários estímulos nocivos. TRPV1 pode ser ativado pela capsaicina (princípio ativo da *Capsicum sp. conhecido como pimenta*), resiniferatoxina (RTX, princípio ativo da *Euphorbia resinifera*), por altas temperaturas ($> 43^{\circ}\text{C}$), baixo pH ($< 6,5$). Além desses compostos e estímulos físicos e químicos, existem também agentes endógenos capazes de sensibilizar o receptor por diminuir seu limiar de ativação tais como: produtos derivados da lipoxigenase como o 12 e 15 hidroxieicosatetraenóico (12-HPETE e 15-HPETE), presença de bradicinina, prostaglandinas, fatores de crescimento do nervo, anandamina, metabólitos do ácido araquidônico, leucotrieno B4 (LTB4), adenosina trifosfato (ATP), poliaminas, procinetinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. E por fim, pode ainda ser ativado por moléculas presentes no veneno de aranhas, medusas bem como também veneno de cobras (BREDERSON et al., 2013; LEE & GU, 2009; PINGLE et al., 2007, SZALLASI et al., 2007, TREVISANI et al., 2004; NILIUS & SZALLASI, 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

Receptores TRPV1 são predominantemente expressos na medula espinhal, no gânglio da raiz dorsal (GRD) e gânglios trigêmeis (TG), localizadas em neurônios de pequeno diâmetro e fibras C não mielinizadas (CATERINA & JULIUS, 2001; JORGE, 2015) e também em células não neuronais como queratinócitos,

mastócitos, epitélio da bexiga, pulmões e nas células ciliadas da cóclea (BRITO et al., 2014; PECZE et al., 2016).

Os canais TRPV1 desempenham papel importante na inflamação da pele, envolvidos em processos de coceira aguda e crônica (FENG et al., 2017). A ativação do TRPV1 está associada também a dor inflamatória, estando envolvida principalmente na dor muscular crônica, neuropatia diabética, hiperalgesia térmica, hiperalgesia muscular e visceral (JORGE, 2015).

A expressão de canais TRPV1 encontra-se também em doenças neoplásicas no qual agonistas endógenos desse receptor promovem o crescimento de tumores como de tecidos mamários (PECZE, 2016; WEBER et al., 2016).

Sua implicação, portanto, estão associadas desde dor neuropática, distúrbios autoimunes, inflamação neurogênica, câncer e funcionamento das células imunes até mesmo numa hipersensibilidade às vias aéreas (BIRDER et al., 2002; MALENCZYK et al., 2017; BUJAK et al., 2019).

1.5 RECEPTORES TRPV1 NAS VIAS AÉREAS

Receptores TRPs, estão espalhados por todo o trato respiratório, especialmente os receptores TRPV1. Estes estão presente em diversos locais como traquéia, brônquios, musculo liso, alvéolos e vasos sanguíneos, podendo estar presentes também nas células que revestem as vias aéreas e no pulmão (WATANABE et al., 2006).

O receptor TRPV1 é expresso em terminações nervosas denominadas fibras aferentes do tipo C não mielinizadas, presente nas vias aéreas e que quando ativado promove o influxo de íons Ca^{2+} e Na^+ pelos poros centrais, levando a uma alteração no potencial da membrana plasmática neuronal. Esse processo permite a abertura de canais Ca^{2+} e Na^+ dependentes de voltagem, disparando potencial de ação capaz de induzir a liberação de neuropeptídeos sensoriais como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e taquicininas (OLIVEIRA et al., 2016; LEE & GU, 2009).

Esses mediadores agem em células efectoras e promovem respostas reflexas axonais locais como, por exemplo, a quimiotaxia de células inflamatórias, o extravasamento plasmático e a broncoconstrição. Além disso, o potencial de ação

gerado se dirige até o núcleo do trato solitário (NTS), onde a fibra faz sinapse com neurônios de segunda ordem do Sistema Nervoso Central (SNC), e então alguns reflexos defensivos importantes serão mediados por via central (mediadas pelas via eferente do sistema nervoso autônomo), por exemplo, broncoconstrição, secreção de muco, irritação das vias aéreas e tosse. Essas respostas locais mediadas por reflexos axonais e centrais são descritas como o processo de inflamação neurogênica (Figura 1) (OLIVEIRA et al., 2016; LEE & GU, 2009).

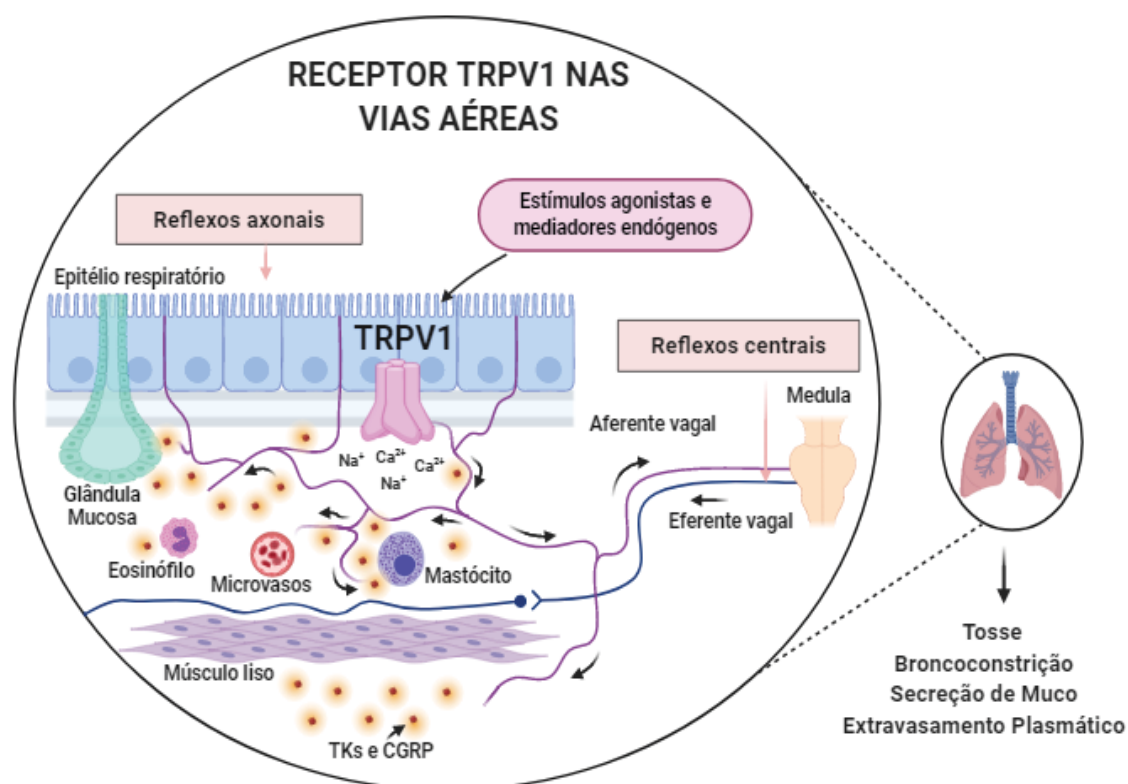


FIGURA 1: Representação esquemática do processo de inflamação neurogênica, e o aparecimento de broncoconstrição e tosse mediada pelo receptor TRPV1 nas vias aéreas. (Figura de Lee & Gu, 2009; modificada pelo Autor, 2021).

Nos últimos anos, o papel do TRPV1 foi amplamente investigado em modelos de animais com patologias respiratórias como tosse, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).

Um estudo realizado com pacientes submetidos à cirurgia do pulmão demonstrou níveis de TRPV1, bradicinina e prostaglandinas E2 (PGE₂) significativamente maiores no pós-operatório quando comparado com o pré-operatório, e em casos de pacientes com tosse aguda ou crônica, os sintomas foram

melhorados bloqueando a via do receptor TRPV1 (ZHU et al., 2019). Além disso, dados de Groneberg et al., (2004) demonstraram um aumento de expressão fenotípica do TRPV1 em mucosas endobrônquicas de pacientes com tosse crônica (KHALID et al., 2014; GRONEBERG et al., 2004). O aparecimento de polimorfismos nos genes do receptor TRPV1 está associado à presença de tosse em pacientes não asmáticos e fumantes (SMIT et al., 2012).

Nos modelos de asma, estudos demonstram que a alta expressão do receptor TRPV1 no epitélio das vias aéreas e na submucosa fora encontrada em pacientes asmáticos em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, quando ativado ele é capaz de liberar citocinas das células epiteliais brônquicas que são pró-inflamatórias (BAXTER et al., 2014).

Em adição, a expressão do RNA mensageiro (mRNA) do TRPV1 fora aumentada em homogenatos de pulmão de pacientes que apresentavam DPOC em comparação com o pulmão de indivíduos não fumantes saudáveis (BAXTER et al., 2014). Outros estudos mostraram que animais expostos a alérgenos e fumaças de cigarro apresentam alterações morfológicas nos nervos das vias aéreas e uma hipersensibilidade aos agonistas do TRPV1 (BRITO et al., 2014). De fato, a capsaicina é comumente usada como estímulo irritativo para as vias aéreas tanto em animais experimentais (TREVISANI & GATTI, 2013), como em humanos (LAUDE et al., 1994) e uma hipersensibilidade para a tosse e broncoconstrição induzida pela capsaicina foi observado em várias doenças respiratórias, incluindo asma e DPOC (WONG & MORICE, 1999; DOHERTY et al., 2000).

Além disso, alguns fármacos podem causar alterações das vias aéreas via ativação de canais TRPs como é o caso do paracetamol que via seu metabólito N-acetyl-parabenzoquinonimine (NAPQI) pode promover reações adversas nas vias aéreas via ativação do receptor TRPA1 (NASSINI et al., 2010). Oliveira et al., (2016) também demonstrou que as alterações das vias aéreas causadas pelo captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, ocorre pela ativação de receptores B₂ de bradicinina com consequente ativação do receptor TRPV1 (OLIVEIRA et al., 2016).

Curiosamente, recentemente, Su et al. (2014) evidenciaram que a simvastatina foi capaz de ativar os canais do TRPV1 aumentando o influxo de Ca⁺² e os níveis de NO endógeno em células endoteliais de camundongos (SU et al., 2014).

Adicionalmente, NO pode ativar o receptor TRPV1 (ZHAO et al., 2016) e bradicinina pode sensibilizar esse canal (VELDHUIS et al., 2015, LUO et al., 1999).

No entanto até o momento, não existe evidências claras da participação do NO na tosse seca causada pelas estatinas. Além disso, não existem estudos demonstrando a participação da bradicinina nem do TRPV1 nas alterações das vias aéreas causadas pelas estatinas.

E adicionalmente, não há relatos de estudos em modelos experimentais envolvendo tosse ou alterações das vias aéreas com a utilização de sinvastatina. Dessa forma, o objetivo dessa proposta foi analisar o papel do NO, dos receptores de bradicinina B₂ e TRPV1 nas alterações das vias aéreas causadas pela sinvastatina.

2 JUSTIFICATIVA

As estatinas são as principais classes de fármacos para a prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares. Baseado nisso é de extrema importância o conhecimento dos efeitos adversos relacionados ao uso desse fármaco.

Fundamentado em pesquisas considera-se que as estatinas são geralmente bem toleradas. Porém, estudos têm demonstrado casos de tosse induzidas em pacientes que fazem uso do tratamento com estatinas mesmo na ausência de lesão pulmonar. A partir de modelos experimentais em animais para detectar alterações na resistência das vias aéreas como e extravasamento plasmático, esse projeto tem como intuito, analisar se os efeitos adversos nas vias aéreas causadas pelas estatinas sinvastatina podem ter o envolvimento de NO, bem como modulação de receptores de bradicinina B₂ e TRPV1, visto que na literatura não há relatos de estudos associando os modelos experimentais citados e o mecanismo de ação por trás das alterações das vias aéreas envolvendo a sinvastatina.

E com a relevância e êxito dessa pesquisa será possível futuramente, propor uma nova abordagem no tratamento de pacientes que apresentam alterações das vias aéreas como tosse e que fazem uso de estatinas, principalmente em pacientes que a substituição do tratamento com a estatinoterapia acaba não sendo uma opção viável.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a sinvastatina promove alterações nas vias aéreas de ratos através de modelos experimentais de broncoconstrição e extravasamento plasmático e se esse efeito é mediado pelo NO, bem como pela ativação dos receptores B₂ de bradicinina e TRPV1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a sinvastatina promove extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos.
- Avaliar se o inibidor da NOS, e antagonistas do receptor B₂ de bradicinina e de TRPV1 reduzem extravasamento plasmático causado pela sinvastatina.
- Verificar se a sinvastatina, *per se*, promove broncoconstrição nas vias aéreas de ratos.
- Verificar se a sinvastatina promove aumento da resposta broncoconstritora induzido pela bradicinina e capsaicina nas vias aéreas de ratos.
- Avaliar se o inibidor da NOS, reduz aumento de broncoconstrição em altas doses de bradicinina em animais não tratados com sinvastatina.
- Avaliar se o inibidor da NOS, antagonista do receptor B₂ de bradicinina e antagonista do TRPV1 reduzem o aumento da broncoconstrição induzida pela bradicinina em ratos tratados com sinvastatina.
- Avaliar se o inibidor da NOS e antagonistas dos receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 reduzem o aumento da broncoconstrição induzida pela capsaicina em ratos tratados com sinvastatina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Animais

Para este estudos foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar machos, pesando entre (250 – 300g), provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, que foram mantidos em condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com comida e água *ad libitum* (máximo de quatro ratos alojados em grupo). Todos os procedimentos experimentais foram realizados após a aprovação do comitê de ética local de Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (Protocolo n° 1328/2019). Os protocolos experimentais foram todos realizados com os animais previamente anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Um número mínimo de animais (6 a 8) foi empregado para a obtenção de dados consistentes.

4.1.2 Drogas e Reagentes

Sinvastatina, capsaicina, azul de Evans, HOE 140, capsazepina, N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), foram adquiridos do Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA. Cloridrato de cetamina (Quetamina®) foi obtido 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 cloreto de sódio (NaCl) P.A. foi obtido da Vetec química fina, RJ, Brasil. O azul de Evans, bradicinina, HOE, e L-NAME foram dissolvidos em NaCl 0,9%. A solução de capsaicina e capsazepina foram diluída em NaCl 0,9% contendo 10% de DMSO e 5% de Tween 80. A sinvastatina fora diluída em NaCl 0,9% contendo 10% de Tween 80 e 10% de DMSO.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Procedimento de ventilação mecânica e artificial em ratos

O procedimento de ventilação mecânica em animais anestesiados foi realizado através de um procedimento cirúrgico que consistiu na inserção de uma cânula na porção cervical da traqueia, sendo fixado com um fio de sutura e conectado 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 2) (THOMAS & WANSTALL, 2003; VALENTI et al., 2005).

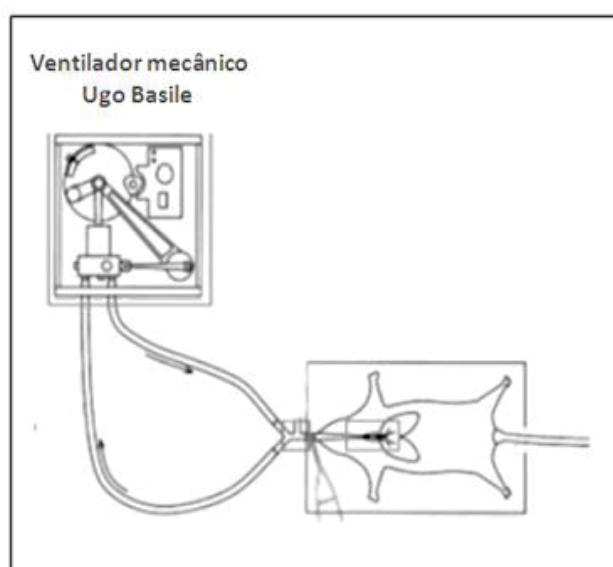


FIGURA 2: Desenho esquemático do procedimento de ventilação mecânica e artificial em ratos. (Fonte: Ugo Basile, modificada pelo Autor, 2021).

4.2.2 Azul de Evans como marcador

Para avaliação do extravasamento plasmático, o corante azul de Evans (30 mg/kg) foi administrado por via intravenosa (i.v.) na veia peniana de animais previamente anestesiados. A administração do corante através da via i.v. é capaz de se ligar as proteínas plasmáticas.

Em condições patológicas, o aumento da permeabilidade vascular permite o extravasamento dessas proteínas para o interstício, e conseqüentemente a formação de edema. A exsudação de proteínas no processo inflamatório pode então ser detectada e quantificada pelo corante Azul de Evans ligado a essas proteínas plasmáticas determinando, portanto, o extravasamento plasmático (MACEDO, 2010).

4.2.3 Indução de extravasamento plasmático pela sinvastatina na traqueia e brônquio de ratos artificialmente ventilados

A avaliação do efeito da sinvastatina no extravasamento plasmático em vias aéreas de ratos foi realizada, primeiramente com os animais submetidos à anestesia e ao procedimento de ventilação mecânica. Logo após 10 minutos de espera para restabelecer o basal respiratório do animal, foi realizada a administração por via intravenosa (i.v.) de sinvastatina (5, 10 e 20 mg/kg) (BANZATO, 2013; WAYMAN et al., 2003; NÉSIC et al., 2006) ou seu veículo (DMSO 10%, Tween 80 10% e NaCl 0,9%; 1ml/kg) na veia peniana do animal. Após um minuto foi realizado a injeção i.v. do corante azul de Evans (30 mg/kg). Após 15 minutos, foi realizado o procedimento de perfusão transcardíaca, procedimento que é executado com abertura do tórax do animal inserindo uma cânula no ventrículo esquerdo até a aorta. O NaCl 0,9% foi utilizado na perfusão e o átrio direito foi seccionado para permitir uma melhor perfusão.

Após o procedimento foi possível realizar a remoção e limpeza da traqueia e brônquio do animal, os quais foram incubados em 1 ml de formamida e armazenados por aproximadamente 24 horas em temperatura ambiente e no escuro. Após esse tempo, a quantidade de corante extraído foi quantificada em espectrofotômetro (620 nm) e interpolada em uma curva de diluição padrão (0,1 – 30 µg/ml de azul de Evans em formamida). Os valores obtidos foram expressos em micrograma de corante por grama de tecido pesado (µg/g) (CZIKORA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016; ANDRÈ et al., 2008). O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 3).

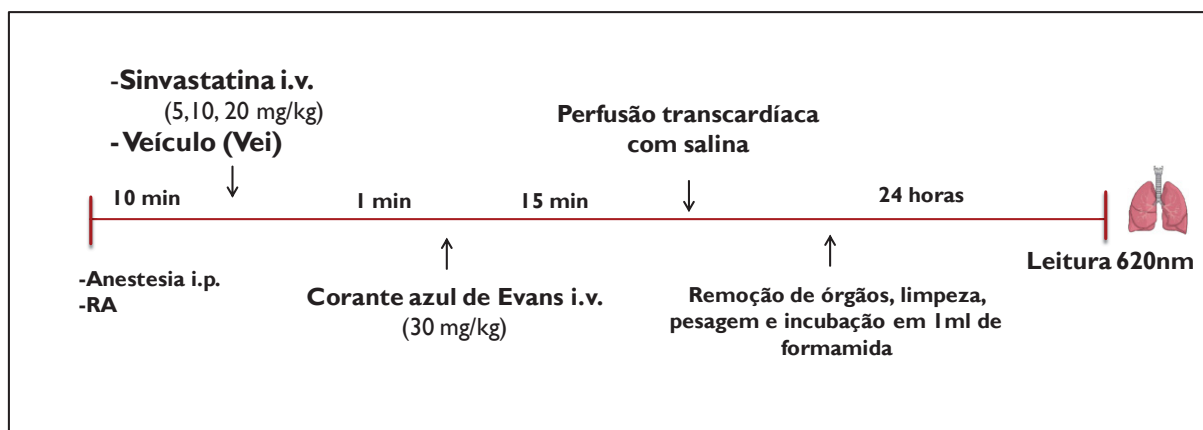


FIGURA 3: Representação esquemática do protocolo 4.2.3. Protocolo experimental do extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina na traqueia e brônquio de ratos ventilados mecanicamente. i.p.; intraperitoneal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados (Fonte: O autor, 2021).

4.2.4 Efeito do inibidor da NOS e antagonistas dos receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 no extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente

Para estudar o envolvimento do NO, e receptor B₂ de bradicinina bem como receptor TRPV1 no extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina, os animais foram anestesiados e submetidos à ventilação mecânica e após 10 minutos de restabelecimento do basal, foi realizado o tratamento com o inibidor da NOS (L-NAME, 30 mg/kg, i.p.) (KWASNIEWSKI et al., 2004), antagonista do receptor B₂ de bradicinina, HOE 140 (HOE, 10 nmol/50 µl, i.t.) (VALENTI et al., 2005), antagonista do receptor TRPV1, capsazepina (100 nmol/50 µl, i.t.) (GEPETTI et al., 1993; TREVISANI et al., 2005), ou seus respectivos veículos. Quinze minutos após foi realizado o tratamento com sinvastatina (20 mg/kg, i.v.) (BANZATO, 2013; WAYMAN et al., 2003; NÉSIC et al., 2006). Um minuto após a administração de sinvastatina, foi então realizado a administração do corante Azul de Evans por via i.v., e 15 minutos após foi realizado a perfusão transcardíaca com a remoção da traqueia e brônquio e mensuração do corante no dia seguinte, como descrito anteriormente. O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 4).

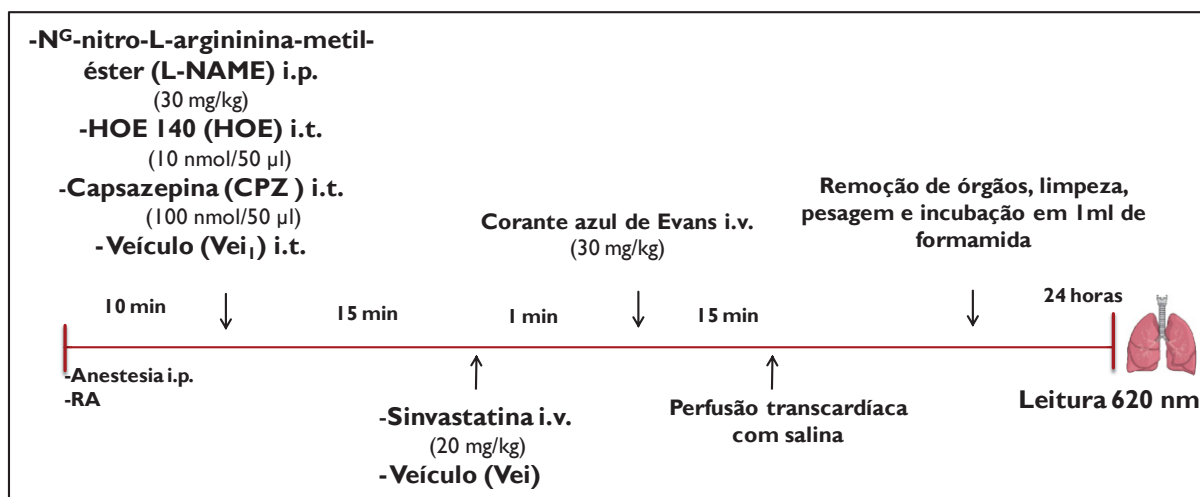


FIGURA 4: Representação esquemática do protocolo 4.2.4. Protocolo experimental do extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina para avaliar os efeitos do inibidor da NOS e dos antagonistas dos receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 na traqueia e brônquio de ratos ventilados artificialmente. i.p.; intraperitoneal; i.t., intratraqueal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados (Fonte: O autor, 2021).

4.2.5 Broncoconstrição induzida pela sinvastatina nas vias aéreas de ratos artificialmente ventilados

Para averiguar se a sinvastatina é capaz de promover alteração da resposta broncoconstritora, a análise do efeito da sinvastatina na broncoconstrição em vias aéreas de ratos foi avaliada com animais anestesiados e traqueostomizados, submetidos à ventilação mecânica, onde o equipamento foi conectado a um transdutor de broncoespasmo (Ugo Basile Rodent Ventilator 7025; 50 movimentos/min; 10 ml kg⁻¹; Ugo Basile, Comerio-Varese, Itália) (THOMAS & WANSTALL, 2003; VALENTI et al., 2005), contendo uma coluna de deslocamento com pressão expiratória final positiva (PEEP)(que foi mantida entre 10 e 11 cm de H₂O durante todo o experimento) e um computador com o programa LabScribe Software para registrar a frequência respiratória ao longo de todo o procedimento.

Após serem submetidos à ventilação mecânica, foi necessário um período de 10 minutos para restabelecer o basal respiratório do animal e então os animais foram tratados com sinvastatina (5, 10 ou 20 mg/kg, i.v.) (BANZATO, 2013; WAYMAN et al., 2003; NÉSIC et al., 2006) ou seu veículo (DMSO 10%, Tween 80 10% e NaCl 0,9%; 1ml/kg, i.v.) pela veia peniana do animal. Os resultados da

resistência pulmonar foram registrados pelo programa LabScribe Software. O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 5).

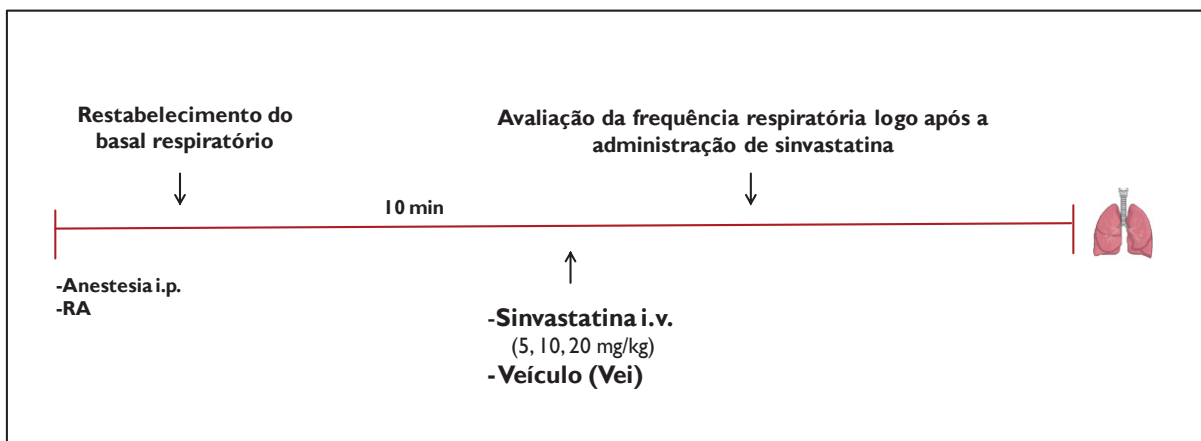


FIGURA 5: Representação esquemática do protocolo 4.2.5. Protocolo experimental de broncoconstrição induzida pela sinvastatina em ratos respirando artificialmente. i.p.; intraperitoneal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados (Fonte: O autor, 2021).

4.2.6 Broncoconstrição induzida pela bradicinina e capsaicina em ratos tratados com sinvastatina

Em outra série de experimento, para avaliar um possível aumento da resposta broncoconstritora para bradicinina e capsaicina, animais foram submetidos à anestesia e ventilação mecânica. Após 10 minutos de estabilização do basal respiratório, os animais foram tratados com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.) (BANZATO, 2013; WAYMAN et al., 2003; NÉSIC et al., 2006) ou seu veículo e após 5 minutos, foi administrado por via i.v. bradicinina ou capsaicina ou em doses que *per se* não causam broncoconstrição (30 nmol/kg) (LUNDBERG et al., 1983; ARAKAWA et al., 1992) ou seus veículos. Os resultados da resistência pulmonar foram registrados pelo programa LabScribe Software. O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 6).

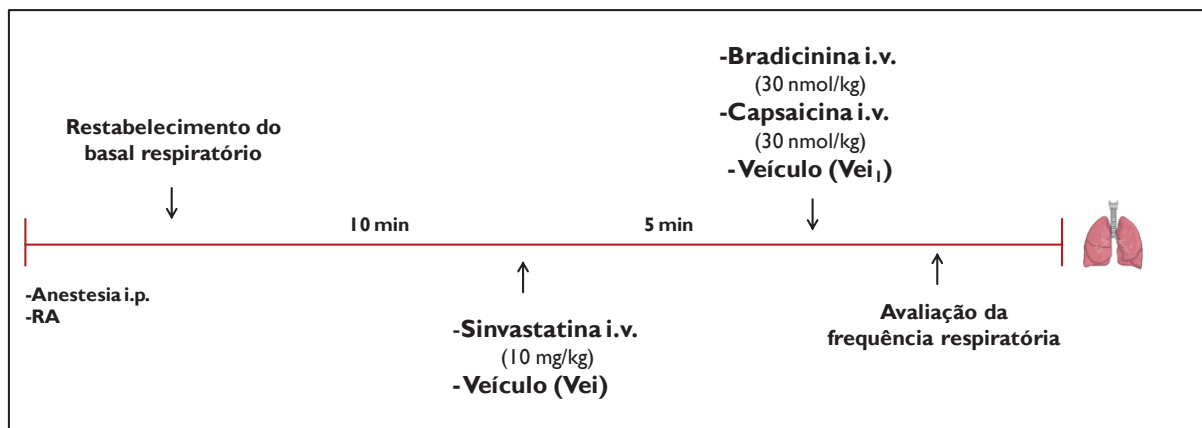


FIGURA 6. Representação esquemática do protocolo 4.2.6. Protocolo experimental da broncoconstrição induzida pela bradicinina ou capsaicina em ratos tratados com sinvastatina. i.p., intraperitoneal, i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados (Fonte: O autor, 2021).

4.2.7 Efeito do inibidor da NOS na broncoconstrição induzida por altas doses de bradicinina em animais não tratados com sinvastatina

Afim de avaliar uma interferência de NO no efeito já conhecido da bradinaína, animais não tratados com sinvastatina após serem anestesiados e submetidos a ventilação mecânica, foram pré-tratados com inibidor da NOS (L-NAME, 30 mg/kg, i.p.) (KWASNIEWSKI et al., 2004), após 15 minutos, foi realizada a administração do agonista do receptor B₂, a bradicinina em altas doses (100 nmol/kg, i.v.). Dose essa devidamente capaz de causar um aumento da resposta broncoconstritora apenas com sua administração (OLIVEIRA et al., 2016). Após a administração do agonista, resultados da resistência pulmonar foram registrados pelo programa LabScribe Software. O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 7).

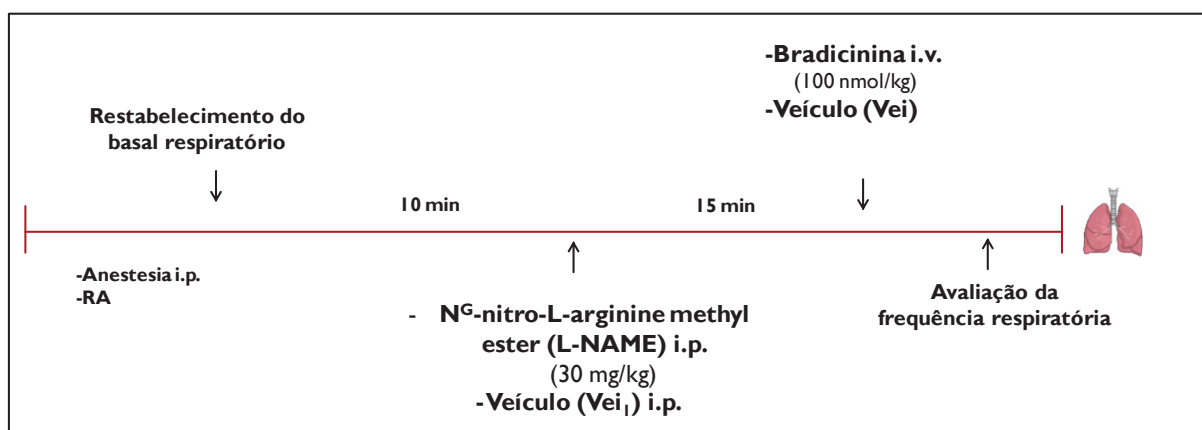


FIGURA 7: Representação esquemática do protocolo 4.2.7. Protocolo experimental para avaliar o efeito inibidor da NOS na broncoconstrição causada por altas doses de bradicinina em ratos não tratados com sinvastatina. i.p., intraperitoneal; i.t.; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados (Fonte: O autor, 2021).

4.2.8 Efeito do inibidor da NOS, dos antagonistas do receptor B₂ e TRPV1 na broncoconstrição induzida por bradicinina em animais tratados com sinvastatina

Com o propósito de avaliar o papel do NO, do receptor B₂ de bradicinina e do TRPV1 no aumento da resposta broncoconstritora induzida pela bradicinina em ratos tratados com sinvastatina, foi realizado experimentos utilizando o inibidor da NOS (L-NAME, 30 mg/kg, i.p.) (KWASNIEWSKI et al., 2004), antagonista do receptor B₂ de bradicinina (HOE 140, 10 nmol/50 µl, i.t.) (VALENTI et al., 2005), antagonista do TRPV1 (capsazepina, 100 nmol/50 µl, i.t.) (GEPPETTI et al., 1993; TREVISANI et al., 2005) ou seus veículos respectivos. Após cerca de 15 minutos com o pré-tratamento do inibidor ou antagonistas, foi realizada a administração de sinvastatina (10 mg/kg, i.v.) (BANZATO, 2013; WAYMAN et al., 2003; NÉSIC et al., 2006), e logo após 5 minutos, foi realizada a administração de bradicinina (30 nmol/kg, i.v.) (LUNDBERG et al., 1983; ARAKAWA et al., 1992) em doses que *per se* não causam broncoconstrição. E então os resultados da resistência pulmonar foram registrados pelo programa LabScribe Software. O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 8).

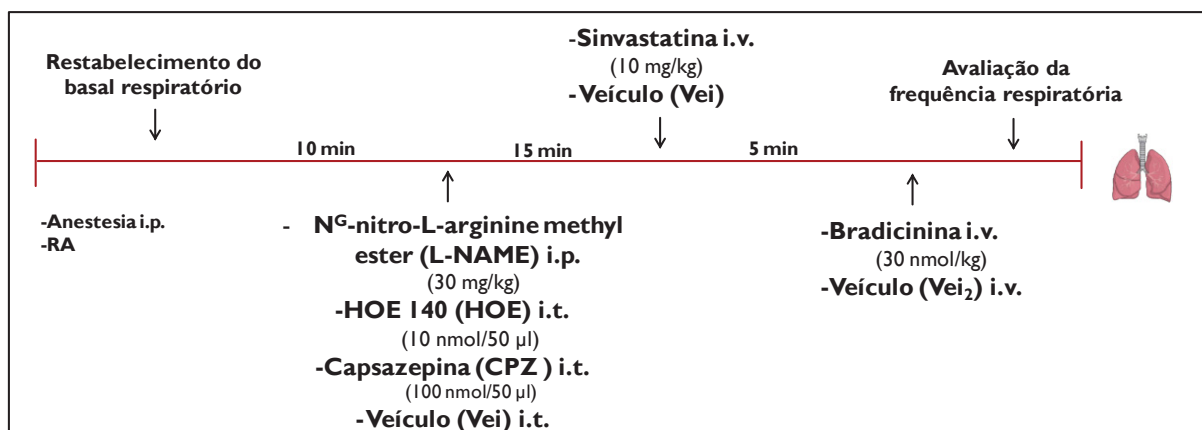


FIGURA 8: Representação esquemática do protocolo 4.2.8. Protocolo experimental para avaliar o efeito inibidor da NOS e dos antagonistas do receptor B₂ e TRPV1 na broncoconstrição causada pela bradicinina em ratos tratados com sinvastatina. i.p., intraperitoneal; i.t., intratraqueal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados (Fonte: O autor, 2021).

4.2.9 Efeito do inibidor da NOS e dos antagonistas do receptor B₂ e TRPV1 na broncoconstrição induzida por capsaicina em animais tratados com sinvastatina

Com a finalidade de avaliar o papel do NO, e dos receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 e no aumento da resposta broncoconstritora induzida pela capsaicina em ratos tratados com sinvastatina, uma série de experimentos foi realizado utilizando o inibidor da NOS (L-NAME, 30 mg/kg, i.p.) (KWASNIEWSKI et al., 2004), antagonista do receptor B₂ de bradicinina (HOE 140, 10 nmol/50 µl, i.t.) (VALENTI et al., 2005), antagonista do receptor TRPV1 (capsazepina, 100 nmol/50 µl, i.t.) (GEPPETTI et al., 1993); TREVISANI et al., 2005) ou seus veículos respectivos. Posteriormente, cerca de 15 minutos após tratamento com o inibidor ou antagonistas, foi realizado a administração de sinvastatina (10 mg/kg, i.v.) (BANZATO, 2013; WAYMAN et al., 2003; NÉSIC et al., 2006), e após 5 minutos, foi realizada a administração de capsaicina (30 nmol/kg, i.v.) (LUNDBERG & SARIA, 1983; ARAKAWA et al., 1992) em doses que *per se* não causam broncoconstrição. Os resultados da resistência pulmonar foram registrados pelo programa LabScribe Software. O protocolo está resumidamente ilustrado abaixo (Figura 9).

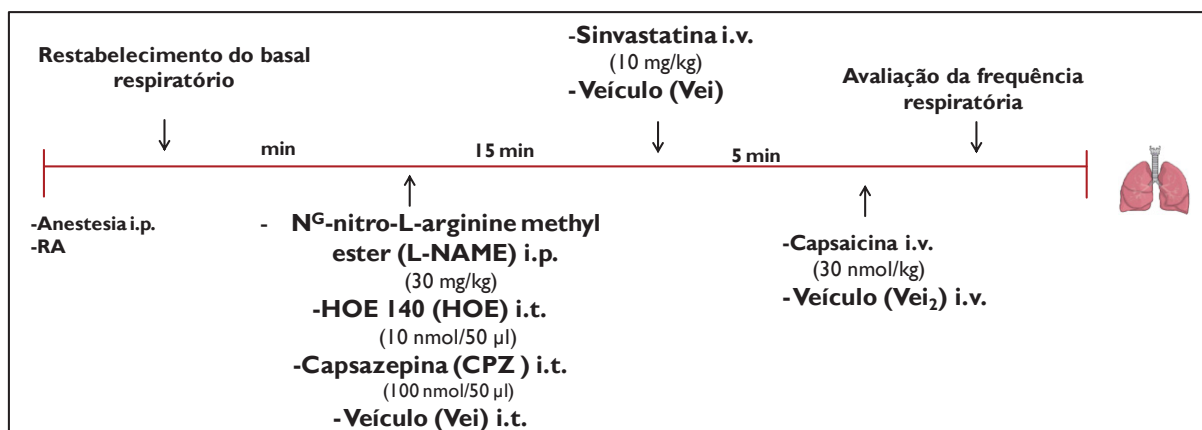


FIGURA 9: Representação esquemática do protocolo 4.2.9. Protocolo experimental para avaliar o efeito inibidor da NOS e dos antagonistas do receptor B₂ de bradicinina e TRPV1 na broncoconstrição causada pela capsaicina em ratos tratados com sinvastatina. i.p., intraperitoneal; i.t., intratraqueal; i.v., intravenoso; RA, ratos artificialmente ventilados (Fonte: O autor, 2021).

4.2.10 Análise Estatística

Os dados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão das médias (e.p.m) de seis a oito animais por grupo. A significância estatística entre os grupos foi avaliada através da análise de variância de uma via (ANOVA) posterior ao pós-teste de Student-Newman-Keuls ou pelo teste t de Student não pareado. O software GraphPad Prism, versão 5.01 fora utilizado e em todos os experimento os valores de $P \leq 0,05$ fora estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA SINVASTATINA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS VENTILADOS ARTIFICIALMENTE

A sinvastatina administrada por via intravenosa (5, 10 mg/kg) após 15 minutos de sua injeção não foi capaz de causar extravasamento plasmático na traqueia e brônquios de ratos artificialmente ventilados, quando comparado ao grupo tratado com o veículo da sinvastatina. Porém, sinvastatina (20 mg/kg) foi capaz de promover um aumento significativo no extravasamento plasmático na traqueia ($79,8 \pm 14,8 \mu\text{g/g}$; Figura 10A) e brônquios ($73,3 \pm 8,8 \mu\text{g/g}$; Figura 10B) de ratos ventilados artificialmente quando comparado com o grupo tratado com o veículo da sinvastatina ($34,2 \pm 3,6 \mu\text{g/g}$ e $29,3 \pm 5,3 \mu\text{g/g}$) na traqueia e brônquio de ratos, respectivamente.

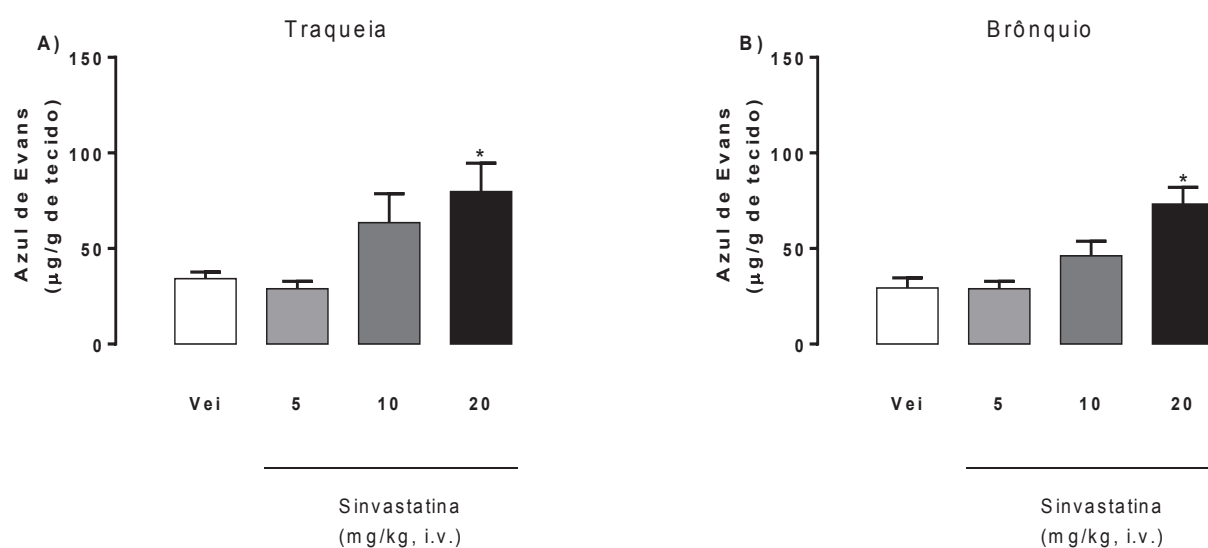


FIGURA 10: Curva dose-resposta para o extravasamento plasmático causado pelo tratamento intravenoso (i.v.) com sinvastatina (5, 10 e 20 mg/kg, i.v.) ou seu veículo (Veil, i.v.) na traqueia (A) e brônquios (B) de ratos sob ventilação mecânica. Cada grupo de animais, (A e B) Veil (n= 8), 5 mg (n= 6), 10 mg (n= 8), 20 mg (n= 8) apresentam os dados da média + e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado com o grupo tratado com veículo da sinvastatina (Veil). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.2 EFEITO DO INIBIDOR DA NOS NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA SINVASTATINA NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS VENTILADOS ARTIFICIALMENTE

O extravasamento plasmático causado pela administração da sinvastatina (20 mg/kg, i.v.) foi significativamente reduzido pelo pré-tratamento de L-NAME (30 mg/kg, i.p.) na traqueia ($21,3 \pm 3,1 \mu\text{g/g}$; Figura 11A) e brônquios ($13,4 \pm 2,3 \mu\text{g/g}$; Figura 11B) de ratos ventilados artificialmente quando comparado com o grupo pré-tratados com os seus respectivos veículos ($78,6 \pm 3,1 \mu\text{g/g}$ e $49,2 \pm 7,6 \mu\text{g/g}$, respectivamente).

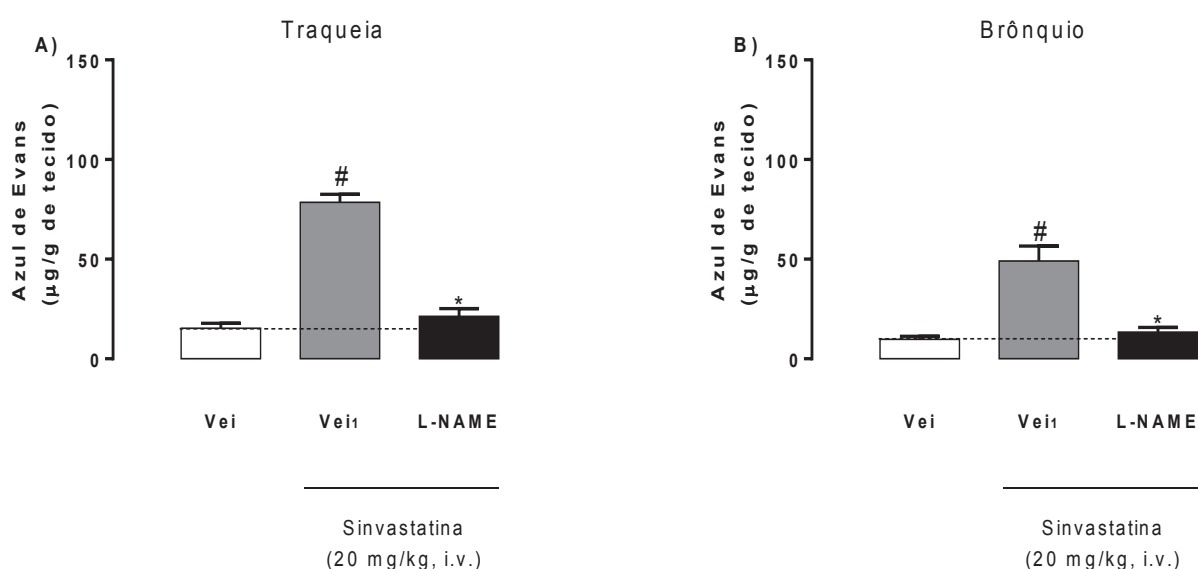


FIGURA 11: Efeito do pré-tratamento intraperitoneal (i.p.) na traqueia (A) e brônquios (B) de ratos com o inibidor da NOS, L-NAME no extravasamento plasmático induzido por sinvastatina em ratos com ventilação mecânica. Ratos mantidos sob ventilação mecânica foram pré-tratados com L-NAME (30 mg/kg, i.p.) ou seu respectivo veículo (Vei₁, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com sinvastatina (20 mg/kg, i.v.) Cada grupo de animal, (A e B) Vei (n=8), Vei₁ (n=8), L-NAME (n=8), apresentam os dados da média + e.p.m. *P ≤ 0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (Vei₁). #P ≤ 0,05 comparado com o grupo pré-tratados com veículo do L-NAME, 15 minutos antes da administração do veículo da sinvastatina (Vei). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.3 EFEITO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR B₂ DE BRADICININA NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA SINVASTATINA NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS VENTILADOS ARTIFICIALMENTE

O extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina (20 mg/kg, i.v.) na traqueia ($95,8 \pm 12 \mu\text{g/g}$) e brônquio ($49,2 \pm 4,9 \mu\text{g/g}$) de ratos ventilados artificialmente foi significativamente reduzido pelo pré-tratamento com HOE 140 (10 nmol/ 50 μl , i.t.) ($45,7 \pm 4,9 \mu\text{g/g}$ e $19,9 \pm 3,5 \mu\text{g/g}$, respectivamente; Figura 12A, B) quando comparado com o grupo tratado previamente com o seu respectivo veículo.

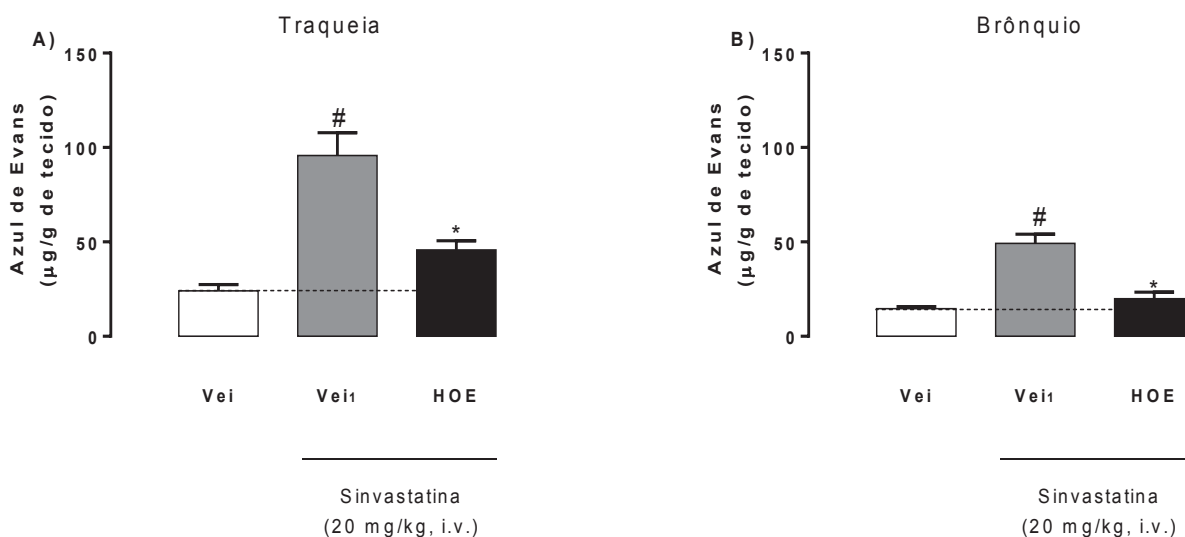


FIGURA 12: Efeito do pré-tratamento intratraqueal (i.t.) na traqueia (A) e brônquios (B) de ratos com o antagonista do receptor B₂, HOE 140 no extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina em ratos com ventilação mecânica. Ratos mantidos sob ventilação mecânica foram pré-tratados com HOE (10 nmol/ 50 μl , i.t.) ou seu respectivo veículo (Vei₁, i.t.) 15 minutos antes do tratamento com sinvastatina (20 mg/kg, i.v.). Cada grupo de animal, (A e B) Vei (n= 8), Vei₁ (n= 8) ou HOE 140 (n= 8), representa os dados da média + e.p.m. *P \leq 0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (Vei₁). [#]P \leq 0.05 comparado com o grupo pré-tratados com veículo do antagonista, 15 minutos antes da administração do veículo da sinvastatina (Vei). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.4 EFEITO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR TRPV1 NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA SINVASTATINA NA TRAQUEIA E BRÔNQUIO DE RATOS VENTILADOS ARTIFICIALMENTE

Os resultados obtidos demonstraram que o extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina (20 mg/kg, i.v.) na traqueia ($65,7 \pm 10,3 \mu\text{g/g}$) e brônquio ($58,7 \pm 9,2 \mu\text{g/g}$) de ratos com ventilação mecânica fora significativamente reduzido na traqueia ($19,4 \pm 4,7 \mu\text{g/g}$; Figura 13A) e brônquio ($15,7 \pm 4,6 \mu\text{g/g}$; Figura 13B) pelo pré-tratamento com a capsazepina (100 nmol/50 μl , i.t.) quando comparado com o grupo tratado previamente com os veículos respectivos.

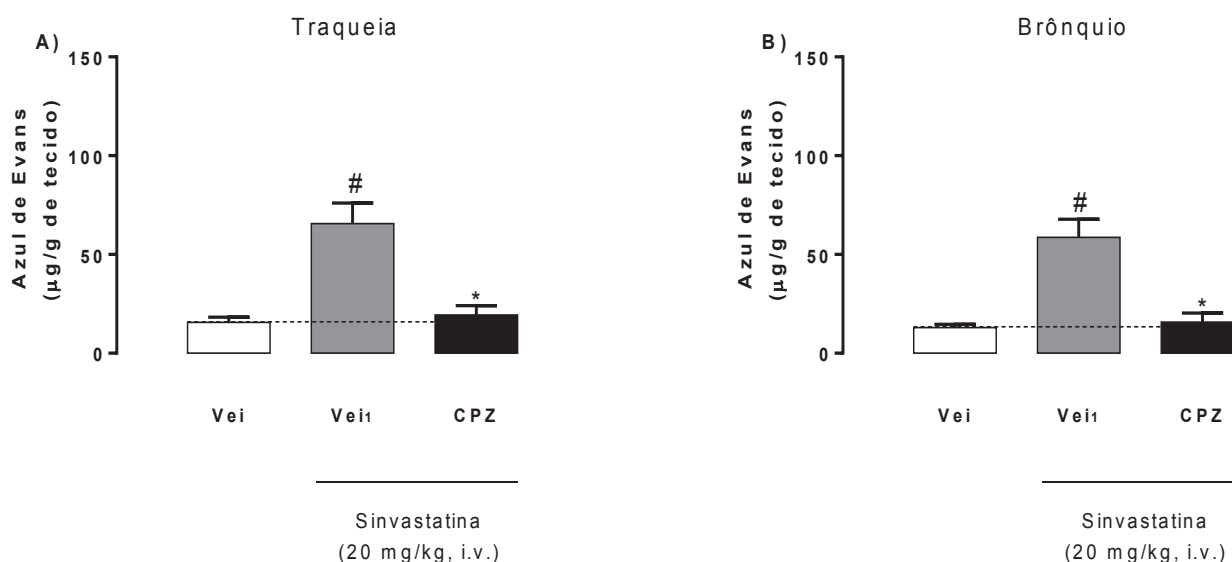


FIGURA 13: Efeito do pré-tratamento intratraqueal (i.t.) na traqueia (A) e brônquios (B) utilizando o antagonista do receptor TRPV1, capsazepina (CPZ) no extravasamento plasmático induzido por sinvastatina em ratos com ventilação mecânica. Ratos mantidos sob ventilação mecânica foram pré-tratados com CPZ (100 nmol/50 μl , i.t) ou seu respectivo veículo (Vei₁, i.t.) 15 minutos antes do tratamento com sinvastatina (20 mg/kg, i.v.). Cada grupo de animal, (A e B) Vei (n= 8) Vei₁ (n=8), CPZ (n= 8), apresenta os dados da média + e.p.m. * $P \leq 0,05$ comparado com o grupo tratado com veículo (Vei₁). # $P \leq 0,05$ comparado com o grupo pré-tratados com veículo do antagonista, 15 minutos antes da administração do veículo da sinvastatina (Vei). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.5 AUMENTO DA RESPOSTA BRONCOCONSTRITORA PARA A BRADICININA OU CAPSAICINA EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA

Os resultados demonstraram que a administração de sinvastatina por via intravenosa (5, 10 e 20 mg/kg) em ratos ventilados artificialmente, não foi capaz de causar broncoconstrição *per se* (dados não mostrados). No entanto, animais tratados com bradicinina (30 nmol/kg, i.v.), em doses que *per se* não causam broncoconstrição, apresentaram um aumento da resposta broncoconstrictiva ($0,7 \pm 0,1$ H₂O/ml; Figura 14A) nas vias aéreas de ratos pre-tratados com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.), quando comparado com o grupo tratado com o veículo da sinvastatina ($0,1 \pm 0,04$ H₂O/ml).

Adicionalmente, animais ventilados mecanicamente e tratados com capsaicina em doses que *per se* não causam broncoconstrição (30 nmol/kg, i.v.) também apresentaram um aumento da resposta broncoconstritora ($0,8 \pm 0,1$ H₂O/ml e $1,4 \pm 0,08$ H₂O/ml; Figura 14B) nas vias aéreas de ratos pre-tratamento com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.) respectivamente quando comparado com o grupo tratado com o veículo da sinvastatina ($0,04 \pm 0,01$ H₂O/ml).

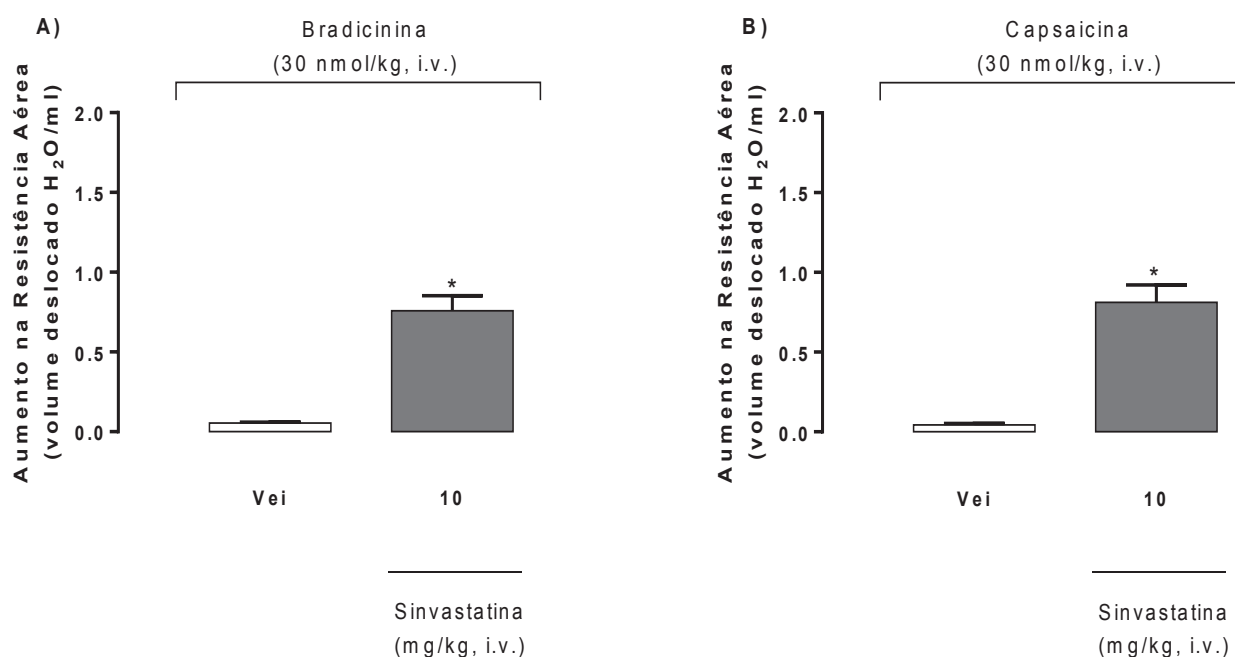


FIGURA 14: Efeito do aumento da resposta broncoconstritora para bradicininina (A) e capsaicina (B) nas vias aéreas de ratos tratados com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.). As doses do agonista do receptor B₂ de bradicininina (bradicininina) ou do receptor TRPV1 (capsaicina) que não foram capazes de causar broncoconstrição, *per se*, foram utilizadas nesse experimento. Cada grupo de animal (A), Vei (n= 8), 10 mg/kg (n= 8), e (B) Vei (n= 8), 10 mg/kg (n= 8), representa os dados da média + e.p.m. *P≤0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (Vei) da sinvastatina. Teste *t* de student não pareado.

5.6 EFEITO DO INIBIDOR DA NOS NO AUMENTO DA RESPOSTA BRONCOCONSTRITORA INDUZIDA PELA BRADICININA EM RATOS NÃO TRATADOS E TRATADOS COM SINVASTATINA

Observamos que o pré-tratamento intraperitoneal com o inibidor da NOS (L-NAME, 30 mg/kg), em animais não tratados com sinvastatina inibiu ($0,08 \pm 0,02$ H₂O/ml; Figura 15A) a broncoconstrição induzida pela bradicinina (100 nmol/kg, i.v.) ($0,7 \pm 0,01$ H₂O/ml), dose essa capaz de promover resposta broncoconstritora *per se*.

Nossos resultados também demonstram que ratos pré-tratados com sinvastatina apresentaram uma exacerbação da resposta broncoconstritora para a bradicinina (30 nmol/kg, i.v.) ($0,7 \pm 0,1$ H₂O/ml). Essa resposta broncoconstrictiva foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento com o inibidor da NOS (L-NAME, 30 mg/kg, i.p.) ($0,1 \pm 0,01$ H₂O/ml; Figura 15B).

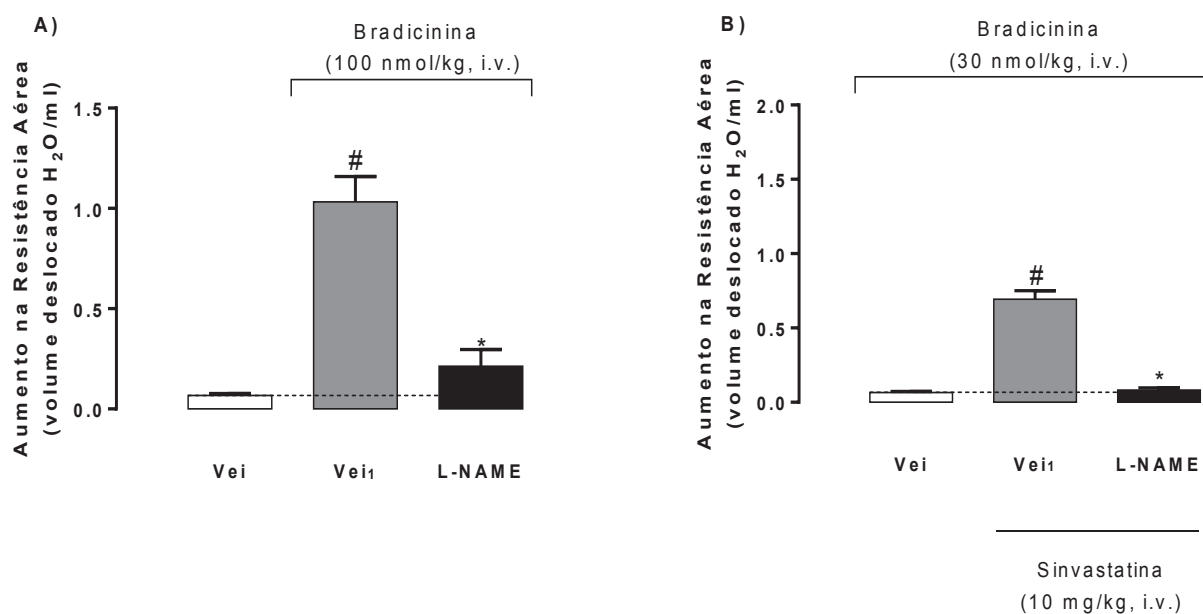


FIGURA 15: Efeito do pré-tratamento com o inibidor da NOS, L-NAME i.p. (A, B) na broncoconstrição induzida por bradycininina em ratos. Ratos sob ventilação mecânica foram pré-tratados com L-NAME (30 mg/kg, i.p.) ou seu respectivo veículo, 15 minutos antes da administração de bradycininina (100 nmol/kg, i.v., A). L-NAME (30 mg/kg, i.p.), ou seu respectivo veículo (Vei₁, i.t.) foram injetados 15 minutos antes do tratamento com simvastatina (10 mg/kg, i.v.) e bradycininina (30 nmol/kg, i.v.; B e C). Cada grupo de animal, (A) Vei (n=6), Vei₁ (n=6), L-NAME (n=6); (B) Vei (n= 7), Vei₁ (n= 7), L-NAME (n= 7) representam os dados da média + e.p.m. *P≤0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (Vei₁). #P ≤ 0.05 comparado com o grupo tratado previamente com veículo do inibidor da NOS, 15 minutos antes da administração do veículo da simvastatina e bradycininina (Vei). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.7 EFEITO DOS ANTAGONISTAS DO RECEPTOR B₂ E TRPV1 NO AUMENTO DA RESPOSTA BRONCOCONSTRITORA INDUZIDA PELA BRADICININA EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA

Animais pré-tratados com o antagonista do receptor B₂ de bradicinina (HOE 140, 10 nmol/ 50 µl, i.t.) também apresentaram inibição da broncoconstrição ($0,1 \pm 0,01$ H₂O/ml; Figura 16A) causado pela bradicinina (30 nmol/kg, i.v.) ($0,6 \pm 0,1$ H₂O/ml) em animais pre-tratados com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.).

Adicionalmente, o pré-tratamento com o antagonista do TRPV1 (capsazepina, 100 nmol/ 50 µl, i.t.) inibiu a resposta broncoconstritora ($0,1 \pm 0,03$ H₂O/ml; Figura 16B) para a bradicinina (30 nmol/kg, i.v.) ($0,7 \pm 0,11$ H₂O/ml) em animais tratados com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.).

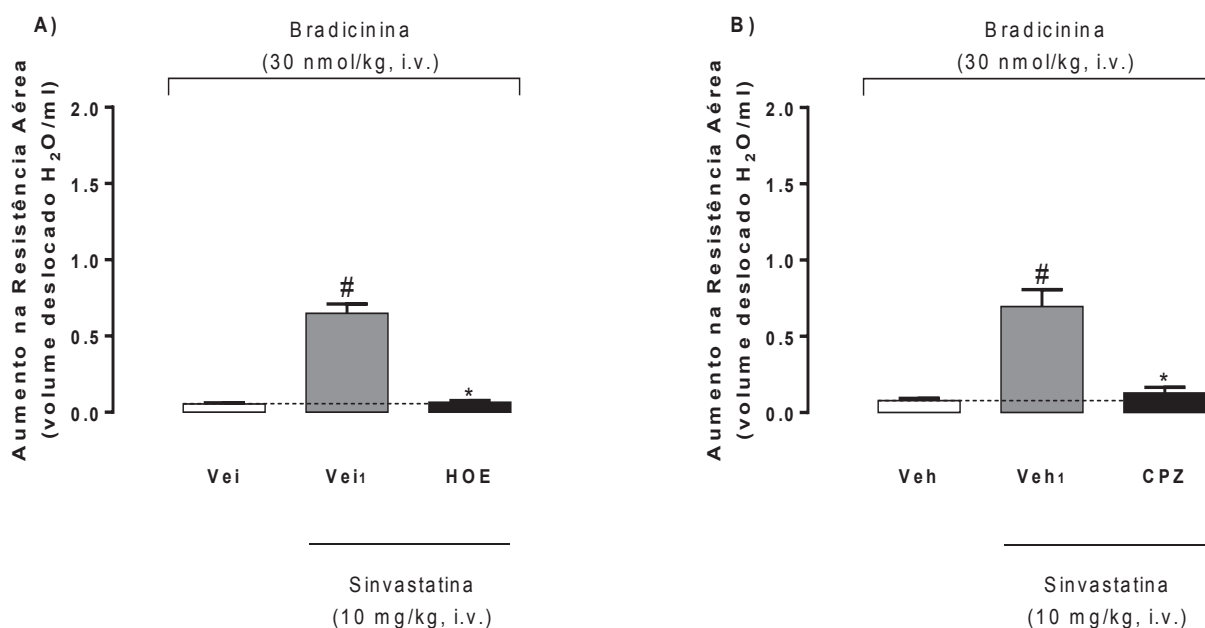


FIGURA 16: Efeito do pré-tratamento com os antagonistas do receptor B₂ e TRPV1, HOE-140 e CPZ, i.t. respectivamente (A, B) na broncoconstrição induzida por bradicinina em ratos. Ratos sob ventilação mecânica foram pré-tratados com HOE (10 nmol/ 50 µl, i.t.) ou CPZ (100 nmol/ 50 µl, i.t.) ou seus respectivos veículos (Vei₁, i.t.), 15 minutos antes do tratamento com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.) e bradicinina (30 nmol/kg, i.v.; B e C). Cada grupo de animal, (A) Vei (n=7), Vei₁ (n=7), HOE (n=7); (B) Veh (n= 6), Veh₁ (n= 6), CPZ (n= 6) representam os dados da média + e.p.m. *P≤0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (Vei₁). #P ≤ 0.05 comparado com o grupo tratado previamente com veículo do antagonista do receptor B₂ ou do antagonista do receptor TRPV1, 15 minutos antes da administração do veículo da sinvastatina e bradicinina (Vei). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

5.8 EFEITO DO INIBIDOR DA NOS, DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR B₂ E DO TRPV1 NO AUMENTO DA RESPOSTA BRONCOCONSTRICTIVA INDUZIDA PELA CAPSAICINA EM RATOS TRATADOS COM SINVASTATINA

O aumento da resposta broncoconstritora causado pela capsaicina 30 nmol/kg, i.v., ($0,6 \pm 0,1$ H₂O/ml) em ratos tratados com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.), fora reduzida significativamente ($0,1 \pm 0,02$ H₂O/ml; Figura 17A) com o pré-tratamento, 15 minutos antes, de L-NAME (30 mg/kg, i.p.), quando comparado com animais que foram pré-tratados com o veículo deste antagonista.

Os resultados também demonstraram que o pré-tratamento com HOE 140 (10 nmol/ 50 µl, i.t.) inibiu ($0,1 \pm 0,01$ H₂O/ml; Figura 17B) o aumento da resposta broncoconstritora causada pela capsaicina (30 nmol/kg, i.v), ($0,6 \pm 0,04$ H₂O/ml), em ratos tratados com sinvastatina.

Semelhantemente, a administração de capsazepina (100 nmol/ 50 µl, i.t.) também foi capaz de inibir ($0,1 \pm 0,02$ H₂O/ml; Figura 17C) o aumento da resposta broncoconstritora causada pela capsaicina ($0,7 \pm 0,1$ H₂O/ml) em ratos tratados com sinvastatina.

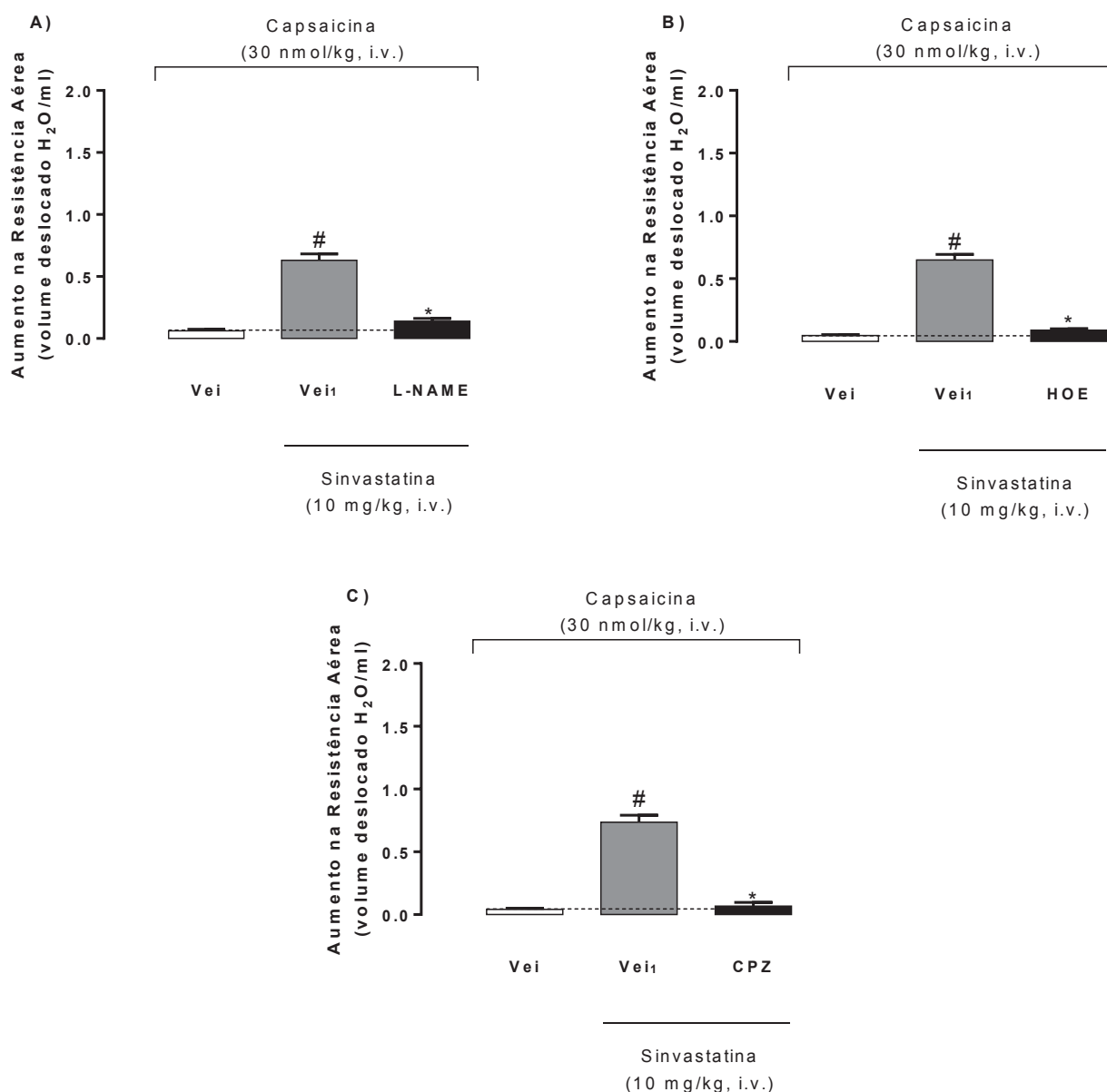


FIGURA 17: Efeito do pré-tratamento intraperitoneal (i.p.) com o inibidor da NOS: L-NAME, (A), intratraqueal (i.t.) com antagonista do receptor B₂ HOE 140 (B) ou antagonista do receptor TRPV1, CPZ (C) na broncoconstrição aumentada pela capsaicina em ratos tratados com sinvastatina. Ratos sob ventilação mecânica foram pré-tratados com CPZ (100 nmol/50 µl, i.t.), HOE (10 nmol/ 50 µl, i.t.), L-NAME (30 mg/kg, i.p.) ou seus respectivos veículos (Veil, i.t.) 15 minutos antes do tratamento com sinvastatina (10 mg/kg, i.v.) e administração de capsaicina (30 nmol/ kg, i.v.). Cada grupo de animal, (A) Vei (n=7), Veil (n= 7), L-NAME (n= 6),(B) Vei (n= 7), Veil (n= 7) e HOE (n= 7), (C) Vei (n= 7), Veil (n= 7), CPZ (n= 7), representa os dados da média + e.p.m. *P≤0,05 comparado com o grupo tratado com veículo (Veil). [#]P ≤ 0.05 comparado com o grupo pré-tratados com veículo dos antagonistas 15 minutos antes da administração do veículo da sinvastatina e capsaicina (Vei). ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

6 DISCUSSÃO

Estatinas são fármacos de primeira escolha para o tratamento de hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares (CEBOVA et al., 2018; STANCU & SIMA, 2001). Essa classe farmacológica apresenta efeitos antioxidantes, propriedades anti-inflamatórias, capacidade para gerar a estabilização das placas ateroscleróticas (XIONG et al., 2016; ABELA et al., 2011).

Contudo, apesar dos diversos benefícios e também serem seguras e de boa tolerabilidade, há estudos relatando importantes efeitos adversos como a miotoxicidade e hepatotoxicidade (BELLOSTA et al., 2004; FARMER & TORRES, 2000). Além desses efeitos clássicos, dados da literatura sugerem o aparecimento de reações pulmonares adversas (HUANG et al., 2013). Assim, é de extrema importância esclarecer efeitos colaterais envolvendo medicamentos, para poder revertê-los o mais rápido possível, uma vez que o diagnóstico clínico de patologias pulmonares ocasionadas por medicamentos é difícil de estabelecer devido à inespecificidade dos achados clínicos, fisiológicos e radiológicos (HUANG et al., 2013).

Dessa forma, utilizando modelos animais de broncoconstrição e extravasamento plasmático, que permitem avaliar a hiperresponsividade das vias aéreas (BEHROOZI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016), investigou-se o papel do NO, receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 no provável mecanismo através do qual a sinvastatina causa efeitos adversos nas vias aéreas de ratos.

Nesse sentido, inicialmente evidenciamos que a sinvastatina em altas doses, promoveu alteração da permeabilidade vascular nas vias aéreas de ratos e também demonstramos que a sinvastatina induziu exacerbação da resposta broncoconstritora à bradicinina e capsaicina.

O papel benéfico das estatinas nas doenças vasculares ateroscleróticas já está bem documentado devido ao seu envolvimento na via de transmissão do NO (DATAR et al., 2010; WOLFRUM et al., 2003; LAUF et al., 2000; GORABI et al., 2019; SUN et al., 2006a). De fato, já fora comprovado que as estatinas podem melhorar a disfunção endotelial, estabilizando o mRNA, aumentando a atividade da enzima eNOS e conseqüentemente aumentando a produção de NO, diminuindo portanto o estresse oxidativo em doenças cardiovasculares. Do mesmo modo, o aumento da atividade de iNOS mediada por estatinas, promovendo efeitos

cardioprotetores também já fora demonstrado (WOLFRUM et al., 2003; ATAR et al., 2006).

Nas vias aéreas, o NO está envolvido na fisiopatologia de várias doenças pulmonares, como discinesia ciliar primária, síndrome de Young, sinusite, rinite alérgica, fibrose cística e até mesmo asma (HORI et al., 2011; SAHIN et al., 2011; BARNES & LIEW, 1995; MANISCALCO et al., 2007).

Alguns estudos relataram que o NO endógeno pode contribuir para o aumento da sensibilidade do reflexo da tosse e extravasamento de plasma nas vias aéreas (LI et al., 2005; HORI et al., 2011). Nesse sentido, dados da literatura demonstraram que um inibidor da NOS (L-NAME) suprimiu o reflexo de tosse induzido pela capsaicina tanto em cobaias sensibilizadas como não sensibilizadas com ovalbumina (HORI et al., 2011). Além disso, a inibição da NOS também atenuou o extravasamento de plasma induzido pela capsaicina na traqueia de ratos (LI et al., 2005).

Também há evidências de que o NO medeia à vasodilatação e o extravasamento plasmático induzido por substância P (SP) (HAN-PIN et al., 1992), que ativa o receptor NK1 de taquicinina para causar extravasamento de proteínas plasmáticas e edema inflamatório (GEPETTI & HOLZER, 1996). Aqui, evidenciamos que o inibidor da NOS, preveniu o extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina. Portanto nós sugerimos que, em nosso modelo experimental, a sinvastatina poderia promover a liberação do NO endógeno ocasionando o extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos.

Reforçando nossos achados, dados na literatura sugerem que o NO é aumentado pelo tratamento com estatinas (ATAR et al., 2006; SU et al., 2014; DATAR et al., 2010). Dessa forma, nossos dados sugerem que o sistema nitrérgico parece participar do extravasamento plasmático das vias aéreas induzido pela sinvastatina.

Por outro lado, dados da literatura também sugerem que os receptores B₂ e TRPV1 estão envolvidos em várias patologias do trato respiratório, incluindo tosse seca e extravasamento de plasma (FOX et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2016; JIA & LEE, 2007; SARIA et al., 1983), uma vez que esses receptores estão espalhados por todo o corpo, sendo amplamente encontrado no trato respiratório. Nesse sentido, muitos estudos sugerem a participação dos receptores B₂ e TRPV1 na sensibilidade aumentada na tosse (LAUDE et al., 1993; LALLOO et al., 1995).

Dessa forma, aqui também foi verificada a participação de receptores B₂ e TRPV1 e a contribuição de ambos no extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos tratados com sinvastatina.

Nossos resultados demonstraram que os receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 também estão envolvidos no extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina. Desta forma, foi demonstrado pelos dados obtidos com os antagonistas de ambos os receptores o HOE 140 e capsazepina, respectivamente, uma inibição no extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina. Assim, esses resultados forneceram evidências de que ambos receptores, também desempenham um papel importante no extravasamento plasmático causado pela sinvastatina nas vias aéreas de ratos.

Embora não esteja claro como a sinvastatina promove a ativação desses receptores, alguns estudos relataram que a administração de estatinas pode aumentar a expressão do receptor B₂ in vitro, aumentando a resposta à bradicinina. De fato, Liesmaa et al. (2007), constatou uma indução da expressão de receptores B₂ por lovastatina em células endoteliais. E recentemente, Zhang et al. (2018) também observou a expressão dos receptores de bradicinina, especificamente o B₂, induzida pela administração de sinvastatina em modelos de isquemia de reperfusão cerebral em ratos (LIESMAA et al., 2007; ZHANG et al., 2018).

Curiosamente, Luo et al. (1999) demonstraram que o tratamento com sinvastatina reduz a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no tecido cardíaco hipertrófico de ratos (LUO et al., 1999). Já está bem estabelecido na literatura, que a inibição da ECA está envolvida na redução da degradação da bradicinina. Esse aumento nos níveis de bradicinina causa a ativação do receptor B₂, resultando em extravasamento plasmático nas vias aéreas e broncoconstrição e tosse (OLIVEIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2021, EMANUELI et al., 1998; FOX et al., 1996; TAKAHAMA et al., 1996).

Frente a essas considerações, não podemos descartar a hipótese que o extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina esteja ocorrendo devido à inibição da atividade da ECA pela sinvastatina o que estaria favorecendo o aumento nos níveis de bradicinina e esta por sua vez estaria ativando o receptor B₂. No entanto, novos estudos são necessários para confirmar essa hipótese e melhor compreender como a sinvastatina causa aumento da resposta para bradicinina via receptor B₂.

Adicionalmente, Su et al. (2014) evidenciaram que a sinvastatina foi capaz de ativar os receptores TRPV1 aumentando o influxo de Ca^{+2} e os níveis de NO endógeno em células endoteliais de camundongos. O mecanismo farmacológico ocorreu pelo fato da sinvastatina provocar influxo de Ca^{2+} , através da ativação do TRPV1, permitindo assim a fosforilação da proteína quinase dependentes de Ca^{2+} /calmodulina do tipo II (CaMKII), aumentando a formação do complexo TRPV1-CaMKII-proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK)-eNOS, ativando portanto a eNOS, aumentando por sua vez a produção de NO. Com base nessas informações e pelo fato da capsazepina ter inibido o extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina em nosso estudo, é possível ainda sugerir que esse efeito esteja ocorrendo via ativação do receptor TRPV1 (Su et al., 2014).

Outro ponto importante evidenciado neste estudo foi que a sinvastatina, por si só, não alterou a resistência pulmonar, mas aumentou a resposta broncoconstritora induzida pela bradicinina. Esse efeito foi acentuadamente atenuado pelo inibidor da NOS e pelo antagonista do receptor B_2 , reforçando que a sinvastatina, em parte, pode estar agindo possivelmente via sistema nitrérgico e ativação do receptor B_2 .

Além disso, a bradicinina é um importante mediador que participa da função vascular via regulação positiva da expressão da enzima NOS, aumentando, portanto a liberação de NO, após a estimulação do receptor de bradicinina. De fato, dados da literatura demonstram que o NO é liberado após a estimulação do receptor de bradicinina (HOMMA, 1999; SU, 2017).

Corroborando com os dados da literatura, em nossos estudos, foi evidenciado também, que a broncoconstrição induzida pela bradicinina, em ratos não tratados com sinvastatina, foi inibida pelo pré-tratamento com L-NAME, sugerindo que o NO é um modulador importante da responsividade das vias aéreas à bradicinina.

Dessa forma, com base nos dados da literatura e nos nossos dados, podemos sugerir que o aumento da resposta broncoconstritora causado pela bradicinina em ratos tratados com sinvastatina esteja ocorrendo pela ativação de receptor B_2 de bradicinina, que uma vez ativado, poderia agora promover a ativação da NOS. Essa ativação da NOS poderia resultar na liberação de NO.

Por outro lado, nós também observamos que o aumento da resposta broncoconstritora para bradicinina em animais tratados com sinvastatina, também fora inibido pelo pré-tratamento intratraqueal com capsazepina. Logo, nossos dados

também sugerem a participação dos receptores TRPV1 na resposta broncoconstritora induzido por bradicinina em ratos pré-tratados com sinvastatina. Além disso, esses dados sugerem que a ativação de receptores B₂ pela bradicinina pode estar ativando indiretamente o receptor TRPV1.

De fato, de Oliveira et al., 2016, demonstraram que a ativação indireta do receptor TRPV1 por meio da estimulação do receptor B₂ pela bradicinina promove extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos tratados com captopril (OLIVEIRA et al., 2016). Do mesmo modo, dados da literatura sugerem que resposta tussígenas induzida por bradicinina possa ocorrer devido à ativação do canal TRPV1, já que o seu antagonista, a capsazepina, inibiu tanto o influxo de Ca²⁺ em neurônios sensoriais vagais de gânglio isolados de cobaia, bem como o aparecimento da tosse induzida por bradicinina (GRACE et al., 2012).

No entanto, estudos também têm mostrado que o NO é capaz de ativar receptores TRPV1. Um estudo realizado com camundongos demonstrou que a ação nociceptiva periférica induzida por NO é mediada por TRPV1, pois quando esse canal é inibido essa ação é comprometida (MIYAMOTO et al., 2009). Além disso, fora demonstrado que o excesso de NO pode ativar a sinalização de TRPV1-Ca²⁺ e ativar a calpaína, uma importante família de proteases de cisteínas não lisossomais, promovendo a degradação de receptores X presentes no fígado (LXRs), como o receptor LXR α (ZHAO et al., 2016).

A ativação de TRPV1 por NO endógeno pode ocorrer de forma direta por meio da modificação da proteína que compõem o canal TRPV1, ocorrendo por meio da S-nitrosilação de cisteína, ou indiretamente através da fosforilação dependente de GMPc /proteína quinase G (PKG) (YOSHIDA et al., 2006; SHIMIZU et al., 2014). Logo, os dados da literatura revelam uma ativação do canal TRPV1 sensível ao NO e sugerem que a produção de níveis endógenos de NO, podem de certa forma ativar o receptor TRPV1.

Porque nossos dados demonstram que a bradicinina atuando em receptores B₂ pode estar liberando NO, e já foi demonstrado na literatura que o NO pode ativar TRPV1, é possível então sugerir que uma relação entre receptor B₂, NO e TRPV1 esteja ocorrendo para promover extravasamento plasmático e broncoconstrição nesses animais tratados com sinvastatina.

Além disso, uma vez que a sinvastatina foi relacionada à inibição da atividade da ECA (LUO et al., 1999), e essa inibição pode inibir a degradação de bradicinina,

não podemos excluir a hipótese de que essa bradicinina liberada após a inibição da ECA possa agir via receptor B₂, o que resultaria na liberação de NO o qual por sua vez poderia ativar o receptor TRPV1 causando assim extravasamento plasmático e broncoconstrição.

Adicionalmente a essas informações, sabe-se que a sensibilização do receptor TRPV1 via receptor B₂ pode ocorrer via ativação de outras cascatas intracelulares.

Dois mecanismos fazem parte desse evento e já estão bem documentados na literatura. Primeiramente, receptores B₂ de bradicinina são receptores acoplados a proteínas G (GPCR) capazes de mediar à ativação de Proteína quinase C (PKC), devido ao seu sistema clássico de segundos mensageiros. Onde, o receptor B₂, faz com que a fosfolipase C seja ativada, liberando dois fragmentos importantes, o inositol 1,4,5- trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG), estes contribuem para a ativação de PKC. O conjunto de enzimas da PKC possui isoformas que permitem a fosforilação do canal TRPV1 possibilitando assim sua ativação (LEE et al., 2004; BONVINI & BELVISI, 2017 ; AMADESI et al., 2004; GRACE et al., 2012; PREMKUMAR & AHERN, 2000).

O segundo mecanismo proposto, envolvem os produtos das vias cicloxigenase e lipoxigenase, no qual receptores B₂ são capazes de realizar a estimulação e liberação do ácido araquidônico, onde os metabólitos eicosanoides produzidos pelas vias cicloxigenase e lipoxigenase tais como: prostaglandinas D2 (PGD₂) e PGE₂, 12-HPETE e 15-HPETE, respectivamente, permitem também a sensibilização do canal TRPV1, através da fosforilação deste canal (AL-SHAMLAN & EL-HASHIM, 2019; PETHO & REEH, 2012).

Sendo assim, não podemos excluir que os produtos das vias da cicloxigenase ou lipoxigenase liberados após a ativação do receptor B₂ de bradicinina também possam, em parte, sensibilizar e ativar indiretamente o receptor TRPV1 para promover extravasamento plasmático e broncoconstrição em ratos tratados com sinvastatina.

De fato, Carnovale et al. (2014), sugere outro provável mecanismo farmacológico por trás da associação das estatinas com o aparecimento da tosse. Os autores sugerem que as estatinas estão envolvidas na produção de prostaglandinas e prostaciclina, as quais seriam as responsáveis pela incidência da tosse seca nos pacientes que fazem uso desses fármacos. Os autores sugerem

ainda, que esses mediadores estariam aumentando o reflexo da tosse através da sensibilização de receptores específicos (CARNOVALE et al., 2014).

Na mesma direção, foi demonstrado que as estatinas podem causar efeitos cardioprotetores pela ação desses mediadores inflamatórios, atribuída pela indução de ciclooxigenase-2 (COX-2), aumentando a atividade da prostaglandina sintetase (BIRNBAUM et al., 2005). Além disso, estudos mostram que os produtos da ciclooxigenase como a PGE₂, podem modular a sensibilidade do reflexo da tosse das vias aéreas à capsaicina inalada através da fosforilação do canal TRPV1 pela proteína quinase A (PKA) (ISHIURA et al., 2007; DEGRAEVE et al., 2001; COLLIER, 1980). No entanto, com base nos nossos dados não podemos sugerir que essas vias estariam envolvidas e outros estudos são necessários para comprovar a participação desses metabólitos derivados do ácido araquidônico nos efeitos causados pelas estatinas nas vias aéreas.

Por outro lado, diante dos nossos achados envolvendo a bradicinina e o seu receptor B₂, bem como o NO, suportamos a hipótese de que a ativação do receptor TRPV1 parece ser uma chave importante no mecanismo envolvendo os efeitos indesejáveis nas vias aéreas após tratamento com sinvastatina. De fato, a ativação do TRPV1 promove influxo de Ca⁺², liberação de SP e CGRP, iniciando inflamação neurogênica local (TAKEMURA et al., 2008), broncoconstrição (DE SWERT & JOOS, 2006; LEE & GU, 2009) e até mesmo o aparecimento de tosse (LEE & GU, 2009, LEE & PISARRI, 2001). E também, nas vias aéreas, o TRPV1 tem efeitos marcantes no tônus do músculo liso, secreções e edema da mucosa (TAKEMURA et al., 2008).

Tomando em conjunto, os dados obtidos nesse estudo suportam a hipótese de uma possível inter-relação entre NO, receptores B₂ e TRPV1 nos efeitos causados pela sinvastatina nas vias aéreas de ratos. Esses dados poderiam explicar, em parte, por que alguns pacientes relatam tosse seca após o tratamento com estatinas e pode contribuir para uma possível estratégia farmacológica para o manejo de pacientes que sofrem com os efeitos adversos das vias aéreas induzidos pelas estatinas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo demonstraram que:

- ✓ O tratamento com sinvastatina na maior dose (20 mg/kg) causou extravasamento plasmático na traqueia e brônquios de ratos sob ventilação mecânica.
- ✓ O pré-tratamento com o inibidor da NOS e com antagonistas dos receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 causaram inibição do extravasamento plasmático na traqueia e brônquio de ratos tratados com sinvastatina (20 mg/kg).
- ✓ A sinvastatina em todas as doses testadas (5, 10 e 20 mg/kg) não foi capaz de causar broncoconstrição *per se* nas vias aéreas de ratos (dados não mostrados).
- ✓ Animais tratados com sinvastatina (10 mg/kg) apresentaram um aumento da resposta broncoconstritora induzida por bradicinina e capsaicina (doses que *per se* não causam alterações nas vias aéreas).
- ✓ O pré-tratamento com o inibidor da NOS, inibiu o aumento da resposta broncoconstritora para bradicinina (dose que *per se* causa broncoconstrição) em animais não tratados com sinvastatina.
- ✓ O pré-tratamento com o inibidor da NOS e antagonistas do receptor B₂ de bradicinina e do TRPV1 causaram inibição do aumento da resposta broncoconstritora induzida pela bradicinina (dose que *per se* não causa broncoconstrição), em ratos tratados com sinvastatina (10 mg/kg).
- ✓ Animais pré-tratados com o inibidor da NOS, antagonistas dos receptores B₂ de bradicinina e TRPV1 apresentaram uma inibição do aumento da resposta broncoconstritora induzida pela capsaicina (dose que *per se* não causa broncoconstrição) em ratos tratados com sinvastatina (10 mg/kg).

Tomando em conjunto, nossos achados sugerem que a sinvastatina promove extravasamento de plasma e broncoconstrição nas vias aéreas de ratos, por meio da ativação indireta do receptor TRPV1. Nossos dados demonstram ainda que a ativação do receptor TRPV1 estaria ocorrendo via NO e receptores B₂ de bradicinina.

Por fim, essa ativação do receptor TRPV1 estaria desencadeando uma resposta inflamatória de origem neurogênica via liberação de neuropeptídeos sensoriais como SP e CGRP, que atuando em células vasculares e não vasculares, promoveria no trato respiratório respostas broncoconstritoras e extravasamento plasmático. Portanto concluímos que a via de receptor B₂ de bradicinina, NO e receptor TRPV1, podem estar envolvidos no aparecimento de broncoconstrição e extravasamento plasmático induzido pela sinvastatina nas vias aéreas de ratos. Logo, esses achados também poderiam explicar, em parte, por que alguns pacientes relatam tosse seca após o tratamento com estatinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELA, G. S.; VEDRE, A.; JANOUDI, A.; HUANG, R.; DURGA, S.; TAMHANE, U. Effect of statins on cholesterol crystallization and atherosclerotic plaque stabilization. **Am J Cardiol.** v. 107, n. 12, p. 1710-1717, 2011.
- 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. 215-221, 2006.
- ADHYARU, B. B.; JACOBSON, T. A. New cholesterol guidelines for the management of atherosclerotic cardiovascular disease risk: a comparison of the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association cholesterol guidelines with the 2014 National Lipid Association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia. **Cardiol Clin.** v. 33, n. 2, p. 181- 196, 2015.
- AL-SHAMLAN, F.; EL-HASHIM, A. Z. Bradykinin sensitizes the cough reflex via a B₂ receptor dependent activation of TRPV1 and TRPA1 channels through metabolites of cyclooxygenase and 12-lipoxygenase. **Respir Res.** v. 20, n. 1, p. 110, 2019.
- AMADESI, J.; NIE, N.; VERGNOLLE, G. S.; COTTRELL, E. F.; GRADY, M.; TREVISANI, M.; MANNI, H.; GEPPETTI, P.; MCROBERTS, J. A.; ENNES, H.; DAVIS, J. B.; MAYER, E. A.; BUNNETT, N. W. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. **J. Neurosci.** v. 24, p. 4300-4312, 2004.
- ANDERSON, T. J.; MANCINI, G. B.; GENEST J. J.; GRÉGOIRE, J.; LONN E. M.; HEGELE, R. A. The new dyslipidemia guidelines: what is the debate? **Can J Cardiol.** v. 31, n. 5, p. 605-612, 2015.
- ANDRÈ, E.; CAMPI, B.; MATERAZZI, S.; TREVISANIN M.; AMADESI, S.; MASSI, D.; VAKSMAN, N.; NASSINI, R.; CIVELLI, M.; BARALDI, P. G.; POOLE, D. P.; BUNNETT, N, W.; GEPPETTI, P.; PATACCHINI, R. 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. 2574-2582, 2008.
- ANTOSOVA, M.; MOKRA, D.; PEPUCHA, L.; PLEVKOVA, J.; BUDAY, T.; STERUSKY, M.; BENCOVA, A. . Physiology of nitric oxide in the respiratory system. **Physiol Res.** v. 66, n. 2, p. 159-172, 2017.
- 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. 131-136, 1992.

- ATAR, S.; YE, Y.; LIN, Y.; FREEBERG, S. Y.; NISHI, S. P.; ROSANIO, S.; HUANG, M. H.; URETSKY, B. F.; PEREZ-POLO, J. R.; BIRNBAUM, Y. Atorvastatin-induced cardioprotection is mediated by increasing inducible nitric oxide synthase and consequent S-nitrosylation of cyclooxygenase-2. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 290, n. 5, p. 1960-1968, 2006.
- BANZATO, P. T. Avaliação da toxicidade reprodutiva da sinvastatina em ratos machos adultos. Botucatu. 54 f. Master's Dissertation – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências (Campus de Botucatu), 2013.
- BARNES, P. J. Bradykinin and asthma. **Thorax**. v. 47, n. 11, p. 979-983, 1992.
- BARNES, P. J.; LIEW, F. Y. Nitric oxide and asthmatic inflammation. **Immunol Today**. v. 16, n. 3, p. 128-130, 1995.
- BARQUERA, S.; PEDROZA, T. A.; MEDINA, C.; HERNÁNDEZ, B. L.; BIBBINS, D. K.; LOZANO, R.; MORAN, A.E. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **Arch Med Res**. v. 46, n. 5, p. 328-38, 2015.
- BATISTA, P. A. Participação dos receptores glutamatérgicos e dos receptores de potencial transitório na ação antinociceptiva do Linalol. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2010.
- BAXTER, M.; ELTOM, S.; DEKKAK, B.; YEW-BOOTH, L.; DUBUIS, E. D.; MAHER, S. A.; BELVISI, M. G.; BIRRELL, M. A. Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung. **Thorax**. v. 69, n. 12, p. 1080-1089, 2014.
- BEHROOZI, M.; PAZHOOHAN, S.; AREF, E.; ZARE, L.; JAVAN, M.; HAJIZADEH, S.; RAOUFY, M. R. Bronchoconstriction Induces Structural and Functional Airway Alterations in Non-sensitized Rats. **Lung**. v. 195, n. 2, p. 167-171, 2017.
- BELLOSTA, S.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Circulation**. v. 109, n. 23, p. 50-57, 2004.
- BIRDER L.A.; NAKAMURA Y.; KISS S.; NEALEN M.L.; BARRICK S.; KANAI A.J.; WANG, E.; RUIZ, G.; GROAT, W.C.; APODACA, G.; WATKINS, S.; CATERINA, M.J. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. **Nat Neurosci**. v. 5, p. 856-860, 2002.
- BIRNBAUM, Y.; YE, Y.; ROSANIO, S.; TAVACKOLI, S.; HU, Z.; SCHWARZ, E. R.; URETSKY, B. F. Prostaglandins mediate the cardioprotective effects of atorvastatin against ischemia–reperfusion injury. **Cardiovasc Res**. v. 65, n. 2, p. 345-355, 2005.

- BONVINI, S. J.; BELVISI, M. G. Cough and airway disease: The role of ion channels. **Pulm Pharmacol Ther.** v. 47, p. 21-28, 2017.
- BOUCHER, J. L.; MOALI, C.; TENU, J. P.; oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. **Cell Mol Life Sci.** v. 55. n. 8-9, p. 1015-1028, 1999.
- BREDESON, J. D.; KYM, P. R.; SZALLASI, A. Targeting TRP channels for pain relief. **European Journal of Pharmacology.** v. 716, p. 61-76, 2013.
- BRIGHTLING, C. E.; SYMON, F. A.; BIRRING, S. S.; BRADDING, P.; WARDLAW, A. J.; PAVORD, I. D. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. **Thorax.** v. 58, n. 6, p. 528-532, 2003.
- BRITO, R.; SHETH, S.; MUKHERJEA, D.; RYBAK, L.; RAMKUMAR, V. TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. **Cells.** v. 3, n.2, p. 517-545, 2014.
- BROADLEYM K. J.; BLAIR, A.E.; KIDD, E. J.; BUGERT, J. J.; FORD, W. R. Bradykinin-induced lung inflammation and bronchoconstriction: role in parainfluenza-3 virus-induced inflammation and airway hyperreactivity. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 335, n. 3, p. 681-692, 2010.
- BUJAK, J. K., KOSMALA, D., SZOPA, I. M., MAJCHRZAK, K., & BEDNARCZYK, P. Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel. **Frontiers in Oncology.** v. 9, p. 1087, 2019.
- CARNOVALE, C.; PELLEGRINO, P.; PERROVE, P.; GENTILI, M.; BRUSADELLI, T.; ANTONIAZZI, S.; SPEZIALI, A.; BORSADOLI, C.; POZZI, M.; CLEMENTI, E.; RADICE, S. Establishing the correlation between statins and cough: case series report and analysis of adverse drug reactions in the international databases. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 70, n. 12, p. 1529-1531, 2014.
- CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. **Annual Review of Neuroscience.** v. 24, n.1, p. 487- 517, 2001.
- CEBOVA, M.; REHAKOVA, R.; KOSUTOVA, M.; PECHANOVA, O. Simvastatin Does Not Affect Nitric Oxide Generation Increased by Sesame Oil in Obese Zucker Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** v. 2, p. 1-7, 2018.
- CESARE, P.; MORIONDO, A.; VELLANI, V.; MCNAUGHTON, P. A. Ion channels gated by heat. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 96, n. 14, p. 7658- 7663, 1999.
- CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature.** v. 426, n. 6966, p. 617-524, 2003.
- COLLIER, H. O.; GARDINER, P. J. Prostaglandin receptors in the airways. **Ciba Found Symp.** v. 78, P. 333-350, 1980.

- COSENS, D. J.; MANNING A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. **Nature**. v. 224, n. 5216, p. 285-287, 1969.
- 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. 78184, 2013.
- DATAR, R.; KAESEMEYER, W. H.; CHANDRA, S.; FULTON, D. J.; CALDWELL, R. W. Acute activation of eNOS by statins involves scavenger receptor-B1, G protein subunit Gi, phospholipase C and calcium influx. **Br J Pharmacol**. v. 160, n. 7, p. 1765-1772, 2010.
- DAVIGNON, J.; GANZ, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**. v. 109, n. 23, p. 27-32, 2004.
- DE SWERT, K. O.; JOOS, G. F. Extending the understanding of sensory neuropeptides. **Eur J Pharmacol**. v. 533, n. 1-3, p. 171-181, 2006.
- DEGRAEVE, F.; BOLLA, M.; BLAIE, S.; CREMINON, C.; QUÉRÉ, I.; BOQUET, P.; LÉVY-TOLEDANO, S.; BERTOGLIO, J.; HABIB, A. Modulation of COX-2 expression by statins in human aortic smooth muscle cells: Involvement of geranylgeranylated proteins. **J Biol Chem**. v. 276, n. 50, p. 46849-46855, 2001.
- DOHERTY, M. J.; MISTER, R.; PERASON, M.; CALVERLEY, P. M. Capsaicin responsiveness and cough in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**. v. 55, n. 8, p. 643-649, 2000.
- DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**. v. 3, p. 99-104, 1993.
- 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. 1299-1304, 1998.
- ERRICO, T. L., CHEN, X., MARTIN CAMPOS, J. M., JULVE, J., ESCOLÀ-GIL, J. C., & BLANCO-VACA, F. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. **Clínica e Investigación En Arteriosclerosis**. v. 25, n. 2, p. 98-103, 2013.
- FARMER, J. A.; TORRE-AMIONE, G. Comparative tolerability of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Drug Saf**. v. 23, n. 3, p. 197-213, 2000.
- FENG, J.; YANG, P.; MACK, M. R.; DRYN, D.; LUO, J.; GONG, X.; LIU, S.; OETIEN, L. K.; ZHOLOS, A. V.; MEI, Z.; YIN, S.; KIM, B. S.; HU, H. Sensory TRP channels contribute differentially to skin inflammation and persistent itch. **Nat Commun**. v. 8, n.1, p. 980, 2017.

- 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. 814-817, 1996.
- 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.; HOLZER, P. Inflammation Neurogenic. **Boca Rat.** v. 1, p. 338, 1996.
- GHONEUM, M. H.; GIMZEWSKI, J. K.; GHONEUM, A. KATANO, H. PAW, U. CN.; AGRAWAL, A. Inhibition of TRPV1 Channel Activity in Human CD4⁺ T Cells by Nanodiamond and Nanoplatinum Liquid, DPV576. **Nanomaterials (Basel).** v. 8, n. 10, p. 770, 2018.
- GORABI, A. M.; KIAIE, N.; HAJIGHASEMI, S.; BANACH, M.; PENSON, P. E.; JAMIALAHMADI, T.; SAHEBKAR, A. Statin-Induced Nitric Oxide Signaling: Mechanisms and Therapeutic Implications. **J Clin Med.** v. 8, n. 12, p. 2051, 2019.
- 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.
- GRONEBERG, D. A. NIIMI, A.; DINH, Q. T.; COSIO, B.; HEW, M.; FISCHER, A. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. **Am J Respir Crit Care Med.** v.170, p. 1276-1280, 2004.
- HAN-PIN, K.; SHUFANG, L.; BARNES, P. J. The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways. **Eur. J. Pharmacol.** v. 221, p. 385-388, 1992.
- HARDIE, R.C. A brief history of trp: Commentary and personal perspective. **Pflugers Arch.** v. 461, p. 493-498, 2011.
- HEWITT, M. M.; ADAMS, G. J.; MAZZONE, S. B.; MORI, N.; YU, L.; CANNING, B. J. Pharmacology of Bradykinin-Evoked Coughing in Guinea Pigs. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 357, n. 3, p. 620-628, 2016.
- HOBBS, A. J.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. **Methods Enzymol.** v. 269, p. 134-148, 1996.
- HOLZER, P.; IZZO, A. A.; The pharmacology of TRP channels. **Br J Pharmacol.** v. 171, n. 10, p. 2469-2473, 2014.
- HOMMA, T. C. J. I. Bradykinin-induced bronchospasm in the rat in vivo: a role for nitric oxide modulation. **Eur Respir J.** v. 13, n. 2, p. 313-320, 1999.

- HORI, A.; FUJIMURA, M.; OHKURA, N.; TOKUDA, A. Involvement of nitric oxide (NO) in cough reflex sensitivity between non-sensitized and OVA-sensitized guinea pigs. **Cough**. v. 22, n.7, p.5, 2011.
- HUANG, L. K.; TSAI, M.J.; TSAI, H. C.; CHAO, H. S.; LIN, F. C.; CHANG, S. C. Statin-induced lung injury: diagnostic clue and outcome. **Postgrad Med J**. v. 89, n. 1047, p. 14-19, 2013.
- ISHIURA, Y.; FUJIMURA, M.; NOBATA, K.; ORIBE, Y.; ABO, M.; MYOU, S. Prostaglandin I₂ enhances cough reflex sensitivity to capsaicin in the asthmatic airway. **Cough**. v. 3, n. 2, 2007.
- JARA-OSEGUERA, A.; NIETO-POSADAS, A. SZALLASI, A.; ISLAS, L.D.; ROSENBAUM, R. Molecular Mechanisms of TRPV1 Channel Activation. **The Open Pain Journal**. v. 3, p. 68-81, 2010.
- JIA, Y.; LEE, L. Y. Role of TRPV receptors in respiratory diseases. **Biochim Biophys Acta**. v. 1772, n. 8, p. 915-27, 2007.
- JORGE, C. O. Envolvimento dos Receptores TRPV1 e TRPA1 na hiperalgesia muscular induzida pela contração isométrica sustentada no músculo gastrocnêmio de ratos. Universidade Estadual de Campinas, Limeira. 26, de fevereiro de 2015.
- JOSEPH, K.; KAPLAN, A. P. Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response. **Adv Immunol**. v. 86, p. 159-208, 2005.
- KAPLAN, A. P.; JOSEPH, K. Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway. **Adv Immunol**. v. 121, p. 41-89, 2014.
- KHALID, S.; MURDOCH, R.; NEWLANDS, A.; SMART, K.; KELSALL, A.; HOLT, K.; DOCKRY, R.; WOODCOCK, A.; SMITH, J. A. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonism in patients with refractory chronic cough: A double-blind randomized controlled trial. **J Allergy Clin Immunol**. v. 134, n. 1, p. 56-62, 2014.
- KWASNIEWSKI, F. H.; LANDGRAF, R.G.; BAKHLE, Y.S.; JANCAR, S. Bronchoconstriction and endogenous nitric oxide in isolated lungs of spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**. v. 488, n. 1-3, p. 181-189, 2004.
- LALLOO, U. G.; FOX, A. J.; BELVISI, M. G.; CHUNG, BARNES, P. J. Capsazepine inhibits cough induced by capsaicin and citric acid but not by hypertonic saline in guinea pigs. **J Appl Physiol**. v. 79, n. 4, p. 1082-1087, 1995.
- LAUDE, E. A.; HIGGINS, K. S.; MORICE, A. H.; A comparative study of the effects of citric acid, capsaicin and resiniferatoxin on the cough challenge in guinea-pig and man. **Pulm Pharmacol**. v. 6, n. 3, p. 171-175, 1993.

- LAUDE, E. A.; MORICE, A. H.; GRATTAN, T. J. The antitussive effects of menthol, camphor and cineole in conscious guinea-pigs. **Pulm Pharmacol.** v. 7, n. 3, p. 179-184, 1994.
- LAUF, U.; GERTZ, K.; HUANG, P.; NICKENIG, G.; BÖHM, M.; DIRNAGL, U.; ENDRES, M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. **Stroke.** v. 10, n. 10, p. 2442-2449, 2000.
- LEE, L. Y.; GU, Q. Role of TRPV1 in inflammation-induced airway hypersensitivity. **Curr Opin Pharmacol.** v. 9, n.3, p. 243-249, 2009.
- LEE, L. Y.; PISARRI, T. E. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. **Respir Physiol.** v. 125, n. 1-2, p. 47-65, 2001.
- LEE, M. G.; KOLLARIK, M.; CHUAYCHOO, B.; UNDEM, B. J. Ionotropic and metabotropic receptor mediated airway sensory nerve activation. **Pulm Pharmacol Ther.** v. 17, n. 6, p. 355-360, 2004.
- LEEB-LUNDBERG, L. M.; MARCEAU, F.; MULLER-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.
- LI, P. C.; SHAW, C. F.; KUO, T. F.; CHIEN, C.T. Inducible nitric oxide synthase evoked nitric oxide counteracts capsaicin-induced airway smooth muscle contraction, but exacerbates plasma extravasation. **Neurosci Lett.** v. 378, n. 2, p. 117-122, 2005.
- LIESMAA, I.; KOKKONEN, J. O.; KOVANEN, P. T.; LINDSTEDT, K. A. Lovastatin induces the expression of bradykinin type 2 receptors in cultured human coronary artery endothelial cells. **J Mol Cell Cardiol.** v. 43, n. 5, 593-600, 2007.
- LIM, K. G. Nitric oxide measurement in chronic cough. **Lung.** v. 188, n. 1, p. 19-22, 2010.
- LIU, H. H.; LI, J. J. Aging and dyslipidemia: a review of potential mechanisms. **Ageing Res Rev.** v. 19, p. 43-52, 2015.
- LOWENSTEIN, C. J.; DINERMAN, J. L., SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann Intern Med.** v. 120, n. 3, p. 227-237, 1994.
- LUNDBERG, J.M.; MARTLING, C.R.; SARIA, A. Substance P and capsaicin-induced contraction of human bronchi. **Acta Physiol Scand.** v. 119, n.1, p. 49-53, 1983.

- LUO, J. D.; ZHANG, W. W.; ZHANG, G. P.; GUAN, J. X.; CHEN, X. Simvastatin inhibits cardiac hypertrophy and angiotensin-converting enzyme activity in rats with aortic stenosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 11, p. 903-908, 1999.
- MACEDO, F. Y. B. Efeito protetor da Interleucina-4 (IL-4) na cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos. Master's Dissertation. Universidade Federal do Ceará, 2010.
- MALENCZYK, K.; GIRACH, F.; SZODORAI, E.; STORMN P.; SEGERSTOLPE, A.; TORTORIELLO, G.; SCHNELL, R.; MULDER, J.; ROMANOV, R. A.; BORÓK, E.; PISCITELLI, F.; MARZO, V. D.; SZABÓ, G.; SANDBERG, R.; KUBICEK, S.; LUBEC, G.; HÓKFELT, T.; WAGNER, L.; GROOP, L.; HARKANY, T. A TRPV1-to-secretagogue regulatory axis controls pancreatic β -cell survival by modulating protein turnover. **Embo J**. v. 36, n.14, p. 2107-2125, 2017.
- MANISCALCO, M.; SOFIA, M.; PELAIA, G. Nitric oxide in upper airways inflammatory diseases. **Inflamm Res**. v. 56, n. 2, p. 58-69, 2007.
- MATHIVANAN, S.; DEVESA, I.; CHANGEUX, J. P.; FERRER-MONTIEL, A. Bradykinin Induces TRPV1 Exocytotic Recruitment in Peptidergic Nociceptors. **Front Pharmacol**. v. 23, n. 7, 178, 2016.
- MAURER, M.; BADER, M.; BAS, M.; BOSSI, F.; CICARDI, M.; CUGNO, M.; HOWARTH, P.; KAPLAN, A.; KOJDA, G.; LEEB-LUNDBERG, F.; LOTVALL, J.; MAGERL, M. New topics in bradykinin research. **Allergy**. v. 66, n. 11, p. 1397-1406, 2011.
- MCFARLAND, A. J.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; ARORA, D. S.; GRANT, G. D.; MCDERMOTT, C. M.; PERKINS, A. V.; DAVERY, A. K. Molecular mechanisms underlying the effects of statins in the central nervous system. **Int J Mol Sci**. v. 15, n. 11, p. 20607-20637, 2014.
- MINKE, B. 2010. The history of the *Drosophila* TRP channel: The birth of a new channel superfamily. **J Neurogenet**. v. 24, p. 216-233, 2010.
- MIYAMOTO, T.; DUBIN, A. E.; PETRUS, M. J.; PATAPOUTIAN, A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLoS One**. v. 4, n. 10, p. 7596, 2009.
- MIZUMURA, K.; SUGIURA, T.; KATANOSAKA, K.; BANIK, R. K.; KOZAKI, Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? **Exp Brain Res**. v. 196, n. 1, p. 53-65, 2009.
- MONTELL, C. 2011. The history of TRP channels, a commentary and reflection. **Pflugers Arch**. v. 461, p. 499-506, 2011.
- 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, p. 694-698, 1994.

- NASSINI, R.; MATERAZZI, S.; ANDRÈ, E.; SARTIANI, L.; ALDINI, G.; TREVISANI, M.; CARNINI, C.; MASSI, D.; PEDRETTI, P.; CARINI, M.; CERBAI, E.; PRETI, D.; VILLETTI, G.; CIVELLI, M.; TREVISAN, G.; AZZARI, C.; STOKESBERRY, S.; SADOFSKY, L.; MCGARVEY, L.; PATACCHINI, R.; GEPPETTI, P. Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents. **Faseb J.** v. 24, n. 12, p. 4904-4916, 2010.
- NÉŠIĆ Z.; TODOROVIC, Z.; STOJANOVIC, R.; JOVANOVIĆ, G. B.; SKODRICH-RADOJEVIĆ, S.; VELICKOVIĆ, R.; CHATTERJEE, P. K.; THIERMERMANN, C.; PROSTRAN, M. Single-Dose Intravenous Simvastatin Treatment Attenuates Renal Injury in an Experimental Model of Ischemia-Reperfusion in the Rat. **J Pharmacol Sci.** v. 102, 413 – 417, 2006.
- NILIUS, 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.
- OLIVEIRA, J. R. J. M.; AMORIM, M. A.; ANDRÉ, E. The role of TRPA1 and TRPV4 channels in bronchoconstriction and plasma extravasation in airways of rats treated with captopril. **Pulm Pharmacol Ther.** v. 18, p. 102004, 2021.
- OLIVEIRA, J. R. J. M.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. BRUSCO, I.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, J.; ANDRÉ, A. Involvement of the TRPV1 receptor in plasma extravasation in airways of rats treated with an angiotensin-converting enzyme inhibitor. **Pulm Pharmacol Ther.** v. 41, p. 25-33, 2016.
- PASCUAL CRUZ, M.; KUSTNER, E. C.; VICENTE, J. A. G.; FERRERO, X. M.; THIO, E. B.; LÓPEZ, J. L. Adverse side effects of statins in the oral cavity. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v. 13, n. 2, p.98-101, 2008.
- PECZE, L.; JOSVAY, K.; BLUM, W.; PETROVICS, G.; VIZLER, C.; OLAH, Z.; SCHWALLER, B. Activation of endogenous TRPV1 fails to induce overstimulation-based cytotoxicity in breast and prostate cancer cells but not in pain-sensing neurons. **Biochim Biophys Acta.** v. 1863, n. 8, p.2054-2064, 2016.
- PEREIRA, M.; VAZ, I. R.; MARQUES, J.; SILVA, A. POLÓNIA, J. Reações Adversas Cardiovasculares: Dislipidemia. **Guia de Reações Adversas a Medicamentos.** Unidade de Farmacovigilância do Sul, 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.
- PSAILA, M.; FSADNI, P.; MONTEFORT, S. Chronic cough as a complication of treatment with statins: a case report. **Ther Adv Respir Dis**. v. 6, n. 4, p. 243-246, 2012.
- PU, J.; ROMANELLI, R.; ZHAO, B.; AZAR, K. M.; HASTINGS, K. G.; NIMBAL, V.; FORTMANN, S. P.; PALANIAPPAN, L. P.; Dyslipidemia in special ethnic populations. **Cardiol Clin**. v. 33, n. 2, p. 325-333, 2015.
- RAIDOO, D. M.; BHOOLA, K. D. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. **Pharmacol Ther**. v. 79, n. 2, p. 105-127, 1998.
- RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Rang & Dale: farmacologia. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- RICCIARDOLO, F. L. M.; FOLKERTS, G.; FOLINO, A.; MOGNETTI, B. Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. **Eur J Pharmacol**. v. 827, p. 181-188, 2018.
- RICCIARDOLO, F. L. Multiple roles of nitric oxide in the airways. **Thorax**. v. 58, n. 2, p. 175-182, 2003.
- RICCIARDOLO, F. L.; TREVISANI, M.; GEPPETTI, P.; NADEL, J.A.; AMADESI, S.; BERTRAND, C. Role of nitric oxide and septide-insensitive NK(1) receptors in bronchoconstriction induced by aerosolised neurokinin A in guinea-pigs. **Br J Pharmacol**. v. 129, n. 5, p. 915-920, 2000.
- ROBBINS, R. A.; GRISAM, M.B. Nitric oxide. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 29, n. 6, p.857-860, 1997.
- SAHIN, G.; KLIMEK, L.; MULLOL, J.; HÖRMANN, K.; WALTHER, L. E.; PFAAR, O. Nitric oxide: A promising methodological approach in airway diseases. **Int Arch Allergy Immunol**. v. 156, n. 4, p. 352-361, 2011.
- 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, n. 3, p. 212, 218, 1983.
- SEABRA, A. B.; DURAN, N. Nanoparticulated nitric oxide donors and their biomedical applications. **Mini Rev Med Chem**. v. 17, n. 3, p. 216-223, 2017.
- SHIMIZU, S.; TAKAHASI, N.; MORI, Y. TRPs as chemosensors (ROS, RNS, RCS, gasotransmitters). **Handb Exp Pharmacol**. v. 223, p. 767-794, 2014.
- SMIT, L. A. M.; KOGEVINAS, M.; ANTÓ, J. M.; BOUZIGON, E.; GONZÁLEZ, J. R.; MOUAL, N. L.; KROMHOUT, H.; CARSON, AE.; PIN, I.; JARVIS, D.; VERMEULEN, R.; JANSON, C.; HEINRICH, J.; GUT, I.; LATHROP, M.; VALVERDE, M. A.; DEMENAI, F.; KAUFFMANN, F. Transient receptor

- potential genes, smoking, occupational exposures and cough in adults. **Respiratory Research**. v. 13, n. 1, p. 26, 2012.
- STANCU, C. SIMA, A. Statins: mechanism of action and effects. **J Cell Mol Med**. v. 5, n. 4, p. 378-387, 2001.
- STAR, R.A. Nitric oxide. **The American journal of the medical sciences**. v. 306, n. 5, p. 348-358, 1993.
- SU, J. B. Role of Bradykinin in the Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Cardiovascular Drugs. **Curr Pharm Des**. v. 23, n. 40, p. 6215-6222, 2017.
- SU, K. H.; LIN, S. J.; WEI, J.; LEE, K. I.; ZHAO, J. F.; SHYUE, S. K.; LEE, T. S. The essential role of transient receptor potential vanilloid 1 in simvastatin-induced activation of endothelial nitric oxide synthase and angiogenesis. **Acta Physiol (Oxf)**. v. 212, n. 3, p. 191-204, 2014.
- SUN, W.; LEE, T. S.; ZHU, M.; GU, C.; WANG, Y.; ZHU, Y.; SHYY, J. Y. Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo. **Circulation**. v. 114, n. 24, p. 2655-2662, 2006a.
- SUN, Y.; LIU, J.; QIAN, F.; XU, Q. Nitric oxide inhibits T cell adhesion and migration by down-regulation of beta1-integrin expression in immunologically liver-injured mice. **Int Immunopharmacol**. v. 6, n. 4, p. 616-626, 2006b.
- 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.; MIYAMATA, 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. 1027-1033, 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, n. 6, 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.
- TREVISANI, M. GATTI, R. TRPV1 Antagonists as Analgesic Agents. **The Open Pain Journal**. v. 6, p. 108-118, 2013.
- 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.; HARRISON, S. 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 59 sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. **Br J Pharmacol.** v. 145, p. 1123-1131, 2005.
- 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.
- VANNI, D. S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A. M.; DAHER, J. P. L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 43, n. 3, p. 181-189, 2007.
- 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.
- VOETS, T.; TALAVERA, K.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. Sensing with TRP channels. **Nat Chem Biol.** v. 1, n. 2, p. 85-92, 2005.
- WATANABE, N.; HORIE, G. J.; MICHAEL, S.; KEIR, D.; SPINA, C. P.; PAGE, J.; PRIESTLEY, V. Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. **Neuroscience.** v. 141, p. 1533-1543, 2006.
- WAYMAN N. S.; ELLIS B. L.; THIEMERMANN C. Simvastatin reduces infarct size in a model of acute myocardial ischemia and reperfusion in the rat, **Med Sci Monit.** v. 9, n. 5, p.195-199, 2003.
- WEBER, L. V.; AL-REFAE, K.; WOLK, G.; BONATZ, G.; ALTMULLER, J.; BECKER, C.; GISSELMANN, G.; HATT, H. Expression and functionality of TRPV1 in breast cancer cells. **Breast Cancer: Targets and Therapy. Breast Cancer (Dove Med Press).** v. 13, n. 8, p. 243-252, 2016.
- WOLFRUM, S.; JENSEN, K. S.; LIAO, J. K. Endothelium-dependent effects of statins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 23, n. 5, p. 729-736, 2003.
- WONG, C. H.; MORICE, A. H. Cough threshold in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax.** v. 54, n. 1, p. 62-64, 1999.
- XIONG, B.; WANG, C.; TAN, J.; CAO, Y.; ZOU, Y.; YAO, Y.; QIAN, J.; RONG, S.; HUANG, Y.; HUANG, J. Statins for the prevention and treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Respirology.** v. 21, n. 5, p. 1026-1033, 2016.

- YOSHIDA, T.; INOUE, R.; MORII, T.; TAKAHASHI, N.; YAMAMOTO, S.; HARA, Y.; TOMINAGA, M.; SHIMIZU, S.; SATO, Y.; MORI, Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. **Nat Chem Biol.** v. 2, n. 11, p. 596-607, 2006.
- ZHANG, J.; BAI, Q.; ZHANG, Y. Pretreatment with simvastatin upregulates expression of BK-2R and CD11b in the ischemic penumbra of rats. **J Biomed Res.** v. 32, n. 5, p. 354-360, 2018.
- ZHAO, J. F.; SHYUE, S. K.; LEE, T. S. Excess nitric oxide activates trpv1-ca(2+)-calpain signaling and promotes pest-dependent degradation of liver x receptor α . **Int J Biol Sci.** v. 12, n. 1, p. 18-29, 2016.
- ZHU, Y.; WU, S.; ZHOU, M.; XIE, M.; XIONG, R.; XU, S.; XU, G. Increased expression of TRPV1 in patients with acute or chronic cough after lung cancer surgery. **Thoracic Cancer.** v. 10, n. 4, p.583-584, 2019.