



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITO DO DIIDROCLORETO DE 2,2'-AZOBIS  
(2-METILPROPIONAMIDINA) SOBRE MÚSCULO LISO  
DE TRAQUÉIA DE RATO**

MARIA DIANA MOREIRA GOMES ROLIM

FORTALEZA  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA DIANA MOREIRA GOMES ROLIM

**EFEITO DO DIIDROCLORETO DE 2,2'-AZOBIS  
(2-METILPROPIONAMIDINA) SOBRE MÚSCULO LISO  
DE TRAQUÉIA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. José Henrique Leal Cardoso

FORTALEZA  
2009  
Universidade Estadual do Ceará

Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas

Título do trabalho: EFEITO DO DIIDROCLORETO DE 2,2'-AZOBIS (2-METILPROPIONAMIDINA) SOBRE MÚSCULO LISO DE TRAQUÉIA DE RATO

Autora: MARIA DIANA MOREIRA GOMES ROLIM

Defesa em: 30/06/2009

Conceito Obtido: \_\_\_\_\_

Nota: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>o</sup> Dr. José Henrique Leal Cardoso  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Andrelina Noronha Coelho de Souza  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Otoni Cardoso do Vale  
Universidade Federal do Ceará - UFC

## *Agradecimentos*

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. **José Henrique Leal Cardoso** pela orientação, paciência e oportunidade de ter realizado esse sonho. Obrigada por me fazer sentir-me mais como uma filha do que aluna.

À minha mãe **Maria Denise Moreira Gomes** (*In memoriam*) pela vida, pelo amor e por todo o cuidado e zelo que teve com minha educação.

Aos meus irmãos **Isadora Moreira Gomes, Jerônimo Moreira Gomes e Hercílio Gomes da Silva Filho** por todo carinho e apoio nos momentos em que mais precisei.

Ao meu filho querido e amado **Matheus Gomes Rolim** por fazer de mim a mãe mais orgulhosa do mundo inteiro. Obrigada por me incentivar a vencer e a querer ser melhor como ser humano.

À minha grande amiga e irmã **Dieniffer Peixoto Neves** que esteve comigo desde o começo, me incentivando e ajudando com seu conhecimento científico invejável. Obrigada pelos vários momentos em que chorei sem saber por onde ir e você esteve lá pra me ajudar a seguir adiante. Obrigada pelas palavras de carinho e pela consideração dispensada a mim e a toda a minha família.

Ao amigo **Felipe Crescêncio Lima**, pela eterna amizade, por seu carinho, atenção e companheirismo. Obrigada pelas palavras amigas e pelo ombro oferecido nos meus momentos difíceis.

À professora Prof<sup>a</sup> Dra. **Andreлина Noronha Coelho de Souza**, pela amizade e pela ajuda valiosa para a conclusão desse trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. **Otoni Cardoso do Vale**, pela generosidade e pela ajuda valiosa para a conclusão desse trabalho.

Ao amigo **Pedro Militão de Albuquerque Neto**, pelo incentivo, por ter me ajudado nos momentos mais difíceis e pela maravilhosa convivência no laboratório.

Ao amigo **Francisco José Ferreira dos Santos (Franck)**, pela amizade por ter estado sempre disposto a ajudar.

À amiga **Juliana Fontenele Bizerril**, por ter me apresentado ao Laboratório de Eletrofisiologia.

Aos amigos **Roseli Barbosa, Francisco Walber Ferreira da Silva, Luiz Moreira Junior, Karilane Maria Rodrigues** pela amizade, pelas palavras de incentivo e pela boa convivência no laboratório.

À **FUNCAP**, pelo seu indispensável apoio para a realização do meu projeto de pesquisa.

A **DEUS** por guiar minha vida pelos caminhos do amor, da benevolência e da mansidão. SENHOR, que sejam-lhe prestadas todas as honras, toda a glória e todo o louvor hoje, agora, e por todos os séculos dos séculos. Amém!

Aos demais colegas do Laboratório de Eletrofisiologia e aos funcionários do **Instituto Superior de Ciências Biomédicas**.

*A Deus por tudo  
Aos meus pais Hercílio e Denise  
Ao meu filho amado Matheus  
Aos meus irmãos Hercílio, Jerônimo e Isadora  
dedico este trabalho.*

# Sumário

---

<b>Lista de figuras</b>	<b>10</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>13</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>14</b>
<b>Resumo</b>	<b>18</b>
<b>Abstract</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>RADICAIS LIVRES</b>	<b>22</b>
Conceito	22
Espécies reativas do oxigênio	23
Mecanismos de defesas antioxidantes	27
Estresse oxidativo	30
Peroxidação lipídica	30
Ação do Diidrocloreto de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina)	33
<b>MÚSCULO LISO TRAQUEAL</b>	<b>35</b>
Anatomia e fisiologia	35
Sinalização pelo cálcio	36
Eventos moleculares da contração	36
Acoplamento eletromecânico	41
Acoplamento farmacomecânico	41
Músculo liso traqueal e sua interação com o aumento na produção de radicais livres	43

<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	<b>46</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
Sais e fármacos	49
Soluções	49
Animais	49
Preparação tecidual e mensuração da atividade contrátil	50
Protocolos experimentais	52
Análise estatística	58
<b>RESULTADOS</b>	<b>59</b>
Efeito do AAPH sobre a contração induzida pela acetilcolina em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio	62
Comparação entre o efeito do AAPH sobre a contração induzida pela acetilcolina em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio	63
Efeito do AAPH sobre a contração induzida pela concentração submaximal de potássio em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio	66
Comparação entre o efeito do AAPH sobre a contração induzida pela concentração submaximal de potássio em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio	70
Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio	72
Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais na presença de indometacina, com e sem a preservação do epitélio	74
Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais com a preservação do epitélio, na presença e na ausência de indometacina	76

Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais com a preservação do epitélio e sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina	78
Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais sem a preservação do epitélio, na presença e na ausência da indometacina	80
Efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações com a preservação do epitélio e mantidas em meio isento de $\text{Ca}^{2+}$	82
Efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina e nifedipina	84
Efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina e Y27632	86
Comparação do efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina, Y27632 e nifedipina	88
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>110</b>

## Lista de figuras

---

FIGURA	PÁGINA
1. Redução tetravalente do $O_2$ na mitocôndria até a formação de água	24
2. Reação de Fenton	25
3. Reação de Haber-Weiss	25
4. Reação da exposição da GHS ao agente oxidante	28
5. Reação de recuperação da enzima GHS	28
6. Dismutação de dois radicais $O_2\bullet$ para formar o $H_2O_2$	29
7. Redução do $H_2O_2$ até água e $O_2$	29
8. Reações em cadeia da peroxidação de lipídios	32
9. Fórmula química do diidrocloreto de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH)	34
10. Desenho ilustrativo mostrando o epitélio traqueal, o músculo liso traqueal e a cartilagem hialina em forma de C	35
11. Sumário da cascata de sinalização Rho/ROCK	39
12. Figura representativa das vias de sensibilização das proteínas contráteis ao $Ca^{2+}$	40
13. Esquema ilustrativo da sinalização por $Ca^{2+}$ para contração por acoplamento eletromecânico e farmacomecânico.	42
14. Representação esquemática do setup de contração	51
15. Representação esquemática do protocolo 1	53
16. Representação esquemática do protocolo 1	54
17. Representação esquemática do protocolo 2	54
18. Representação esquemática do protocolo 2	55

19. Representação esquemática do protocolo 3	55
20. Representação esquemática do protocolo 4	56
21. Representação esquemática do protocolo 5	57
22. Representação esquemática do protocolo 6	58
23. Efeito do AAPH sobre a amplitude de contração induzida pela Ach em músculo liso traqueal com preservação do epitélio	60
24. Efeito do AAPH sobre a amplitude de contração induzida pela Ach em músculo liso de traqueal sem preservação do epitélio	62
25. Comparação entre o efeito AAPH sobre a contração induzida pela Ach em músculo liso traqueal com (n=10) e sem a preservação do epitélio (n=9)	65
26. Efeito inibitório do AAPH sobre a contração induzida pelo potássio em músculo liso de traqueal com a preservação do epitélio	67
27. Efeito inibitório do AAPH sobre a contração induzida pelo potássio em músculo liso de traqueal sem a preservação do epitélio	69
28. Comparação entre o efeito do AAPH sobre a contração induzida pelo potássio em preparações traqueais com (n=7) e sem a preservação (n=9) do epitélio	71
29. Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal com (n=11) e sem (n=11) a preservação do epitélio.	73
30. Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal na presença da indometacina, com preservação do epitélio (n=9) e sem a preservação do epitélio (n=11)	75
31. Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal com a preservação do epitélio, na presença (n=9) e ausência da indometacina (n=11)	77

32. Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal com a preservação do epitélio (n=9) e sem a preservação do epitélio, na presença de indometacina (n=11).	79
33. Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio, na presença (n=11) e na ausência (n=11) da IND.	81
34. Efeito próprio do AAPH em músculo liso traqueal em tyrode modificado (n=7) e em meio isento de $Ca^{2+}$ (n=5).	83
35. Efeito próprio do AAPH em músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina e nifedipina.	85
36. Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina e Y27632.	87
37. Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina entre preparações na presença da nifedipina e do Y27632.	89

## Lista de tabelas

---

TABELA	PÁGINA
1. Efeito do AAPH sobre o acoplamento farmacomecânico (concentração 10 $\mu$ M de Ach) em músculo traqueal, com e sem a preservação do epitélio	110
2. Efeito do AAPH ( $EC_{50}$ ) sobre a contração submaximal de acetilcolina na faixa de concentração entre 0,01 a 10 mM	111
3. Efeito do AAPH ( $EC_{50}$ ) sobre a contração submaximal de acetilcolina na faixa de concentração entre 1 a 200 mM	111
4. Efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico (concentração 60 mM de potássio) em músculo traqueal, com e sem a preservação do epitélio	112
5. Efeito do AAPH ( $EC_{50}$ ) sobre a contração de potássio na faixa de concentração entre 0,01 a 200 mM	112
6. Efeito do AAPH sobre o tônus basal em músculo traqueal, com e sem a preservação do epitélio, na presença e ausência da indometacina	113
7. Efeito do AAPH sobre o tônus basal em músculo traqueal, com e sem a preservação do epitélio, na presença e ausência da indometacina, Y27632 e nifedipina	113

## Lista de abreviaturas

---

$[Ca^{+2}]_i$	Concentração interna de cálcio
$[Ca^{+2}]_o$	Concentração externa de cálcio
$[K^+]_o$	Concentração externa de potássio
$\emptyset Ca^2$	Meio isento de cálcio
$^1O_2$	Oxigênio simpleto
AA	Ácido araquidônico
AAPH	Diidrocloreto de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida)
Ach	Acetilcolina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMPC	3,5-monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
$Ca^{+2}$	Cálcio
$Ca^{+2}$ -CaM	Complexo cálcio-calmodulina
CaM	Calmodulina
CAT	Catalase
-CH <sub>2</sub> -	Grupo metileno
COX	Ciclooxigenases
CPI-17	Proteína inibitória ativada por PKC
$Cu^{2+}$	Cobre
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
E.P.M.	Erro padrão da média
E4	Leucotrieno
EC <sub>50</sub>	Concentração que produz 50% do efeito
EGTA	Ácido etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N, N',N'-tetracético
EPT	Epitélio

<b>ERN</b>	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Íon ferroso Oxigênio
<b>GAPs</b>	GTPase ativadoras de proteína
<b>GDI<sub>s</sub></b>	Inibidores de dissociação nucleotídeo guanina
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GEFs</b>	Fator de troca de nucleotídeo de guanina
<b>GMPC</b>	3,5 – monofosfato cíclico de guanosina
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>GSH-Px</b>	Glutathione peroxidase
<b>GSH-Rd</b>	Glutathione reductase
<b>GSSG</b>	Glutathione oxidada
<b>GST</b>	Glutathione-S-Transferases
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HClO</b>	Ácido hipocloroso
<b>IND</b>	Indometacina
<b>IP<sub>3</sub></b>	Trifosfato de inositol
<b>iPs</b>	Isoprostanóides
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>L<sup>•</sup></b>	Radical lipídico
<b>LCIC</b>	Liberação de cálcio induzi
<b>LO<sup>•</sup></b>	Radical alcóxil
<b>LOO<sup>•</sup></b>	Radical peróxil
<b>LOOH</b>	Lipídico hidroperóxido
<b>MC</b>	Média de Controle
<b>MCL20</b>	Miosina de cadeia leve
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnésio

<b>MLCK</b>	Quinase de cadeia leve da miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatase de cadeia leve da miosina
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mn</b>	Mangânes
<b>mV</b>	Milivolts
<b>MYPT1</b>	Subunidade ligada à miosina
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio molecular
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sódio
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NAOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NIF</b>	Nifedipina
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>ns</b>	Não significante
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>O<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Ânion superóxido
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozônio
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxil
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	Radical peroxinitrito
<b>PGG<sub>2</sub></b>	Prostaglandinas E <sub>2</sub>
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandinas H <sub>2</sub>
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PIP2</b>	Bifosfato de fosfotidilinositol
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PL</b>	Peroxidação lipídica
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Enzima fosfolipase C
<b>PP1c</b>	Subunidade catalítica da MLCP
<b>Rho-GEF</b>	Fator de troca do nucleotídeo guanina-Rho
<b>RL</b>	Radicais livres

<b>ROCs</b>	Canais operados por receptor
<b>Se</b>	Selênio
<b>-SH-</b>	Grupamento tiol
<b>SOCs</b>	Canais de cálcio operados por estoques
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TM</b>	Tyrode modificado
<b>TXB2</b>	Tromboxano
<b>UqN<sup>o</sup></b>	Ubiseminquinona
<b>VOCs</b>	Canais operados por voltagem
<b>Y27632</b>	Inibidor da via da enzima Rho-quinase
<b>Zn</b>	Zinco

## Resumo

---

Investigou-se o efeito diidrocloro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) (AAPH), uma substância utilizada para indução de formação de radicais livres (radical peroxil), sobre os parâmetros contrateis do músculo liso de traquéia de ratos. Os experimentos foram realizados em preparações de anéis de traquéia mantidas em Tyrode modificado aerada, em pH 7,4, a 37°C. A força exercida pelo músculo liso traqueal foi medida por um sistema computadorizado para registro isométrico das contrações musculares. O AAPH apresentou efeito bifásico sobre as contrações evocadas por acetilcolina (10 µM). Em concentrações menores o AAPH (0,1 - 10 mM) potencializou as contrações evocadas por acetilcolina em preparações com (EC<sub>50</sub> = 0,8776 ± 0,415 mM) e sem (0,01 - 1 mM) (EC<sub>50</sub> = 0,3388 ± 0,343 mM) a preservação do epitélio. Em concentrações maiores o AAPH (10 -200 mM) inibiu as contrações evocadas por acetilcolina em preparações com (EC<sub>50</sub> = 81,5562 ± 4,284 mM) e sem (EC<sub>50</sub> = 57,7786 ± 8,607 mM) a preservação do epitélio. Sobre acoplamento eletromecânico o AAPH (0,01 - 200 mM) apenas inibiu as contrações evocadas por KCl (60 mM) em preparações com (EC<sub>50</sub> = 57,4037 ± 4,652 mM) e sem (EC<sub>50</sub> = 32,9650 ± 2,652 mM) a preservação do epitélio. Sobre o tônus basal, o AAPH (0,1 - 200 mM) induziu contrações como efeito próprio em preparações com e sem a preservação do epitélio e essas contrações evocadas foram potencializadas, de forma significativa, quando foram incubadas com indometacina (0,2 mM). Em meio isento de Ca<sup>2+</sup> (solução sem adição de Ca<sup>2+</sup> e com adição de 2 mM de EGTA), o AAPH (3 mM). Em presença de indometacina e sem a preservação do epitélio, a nifedipina (10 µM) bloqueou parcialmente, mas de maneira significativa, a contração evocada por AAPH (3 mM). Já o Y27632 (10 µM), bloqueou quase totalmente a contração evocada por AAPH (3 mM), em presença de indometacina e sem a preservação do epitélio. Quando o Y27632 e a nifedipina foram incubados simultaneamente, a inibição da contração do AAPH (3 mM) foi similar à inibição somente em presença do Y27632. Em conclusão, o AAPH apresentou efeito bifásico (potencializou e inibiu) sobre o acoplamento farmacomecânico que foi dependente de concentração, enquanto no acoplamento eletromecânico somente inibiu as contrações. Sobre o tônus basal, o AAPH evocou contração que foram potencializadas em presença de indometacina e inibidas em presença de nifedipina e Y27632. Assim a comparação dos dados do presente trabalho, com os disponíveis na literatura científica para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerem que os efeitos aqui observados não são específicos para a substância AAPH, mas sim originários dos radicais livres por ela produzidos.

**Palavras chave:** Acoplamento excitação-contração, diidrocloro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina), músculo liso, radicais livres, radical peroxil e traquéia.

## Abstract

---

The effects of 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), an inducer agent of free radicals (peroxyl radical) formation, on the rat tracheal smooth muscle. The experiments were performed on tracheal rings preparations maintained in aerated modified Tyrode solution, in pH 7,4 at 37 °C. The strength developed by the tracheal smooth muscle was measured by the isometric regulator in a computerized system. In contractions induced by acetylcholine (10  $\mu$ M), AAPH presented a biphasic effect: contraction potentiation at low concentration on epithelium-intact (0,1 - 10 mM) ( $CE_{50} = 0,8776 \pm 0,415$  mM) and epithelium-denuded (0,01 - 1 mM) ( $CE_{50} = 0,3338 \pm 0,343$  mM) preparations; and contraction inhibition at high concentration on epithelium-intact (10 - 200 mM) ( $CE_{50} = 81,55 \pm 4,284$  mM) and epithelium-denuded (1 - 200 mM) ( $CE_{50} = 57,7786 \pm 8,607$  mM) preparations. On electromechanic coupling, AAPH (0,01 - 200 mM) inhibited contractions induced by KCl (60 mM) in epithelium-intact ( $CE_{50} = 57,4037 \pm 4,652$  mM) and epithelium-denuded ( $CE_{50} = 32,9650 \pm 2,652$  mM) preparations. AAPH (0,1 - 200 mM) increased the resting tonus of both epithelium-intact and epithelium-denuded tracheal smooth muscle and this was also significantly potentiated in presence of indometacin (0,2 mM). In  $Ca^{2+}$ -free medium added of EGTA, AAPH (3 mM) evoked a minimal magnitude contraction in epithelium-intact preparations. In presence of indometacin and epithelium-denuded, the nifedipine (10  $\mu$ M) partially, but significantly, blocked the contraction induced by AAPH (3 mM). Moreover, Y 27632 (10  $\mu$ M) almost completely blocked the contraction induced by AAPH (3 mM), in presence of indometacin and epithelium-denuded. When Y27632 and nifedipine were simultaneously applied, there was no additional inhibition of AAPH contraction. In conclusion, AAPH presented a concentration-dependent biphasic effect (potentiation and inhibition) on pharmacomechanic coupling while it was able to only inhibit the electromechanic coupling. AAPH evoked contractions on the resting tonus which were potentiated in presence of indometacin and inhibited in presence of Y 27632 and nifedipine. Comparing the present data with those available in literature for  $H_2O_2$ , we can suggest that these observed effects are not specific for AAPH, but they are derived from the free radicals induced by AAPH.

**Key words:** excitation-contraction coupling, 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride, smooth muscle, free radicals, peroxyl radical and trachea.

## INTRODUÇÃO

---

As doenças respiratórias têm um grande impacto na população mundial por sua morbidade, mortalidade e custos envolvidos. Além disso, são a 3ª maior causa de mortes no mundo todo, ganhando da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e somente perdendo para as doenças cardiovasculares e doença vascular encefálica. As doenças respiratórias crônicas afetam todas as idades e representam uma carga substancial tanto para o indivíduo como para a sociedade (GRAHAM, 1990).

No Brasil, 15 milhões de pessoas são afetadas por asma, 20 milhões têm rinite alérgica e 5 milhões de brasileiros, com idade acima de 40 anos, apresentam doença obstrutiva pulmonar crônica (DPOC). Esses números demonstram que 2 em cada 10 brasileiros são afetados por uma doença respiratória crônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

A asma é a doença inflamatória crônica mais comum nas vias aéreas e se caracteriza por uma obstrução ao fluxo de ar para o pulmão, cuja causa não está completamente elucidada. Sua fisiopatologia está relacionada ao edema da mucosa brônquica, a hiperprodução de muco nas vias aéreas e a contração da musculatura lisa traqueal, com conseqüente diminuição de seu diâmetro (broncoespasmo) e edema dos brônquios e bronquíolos. Esses eventos resultam em vários sintomas como: dispnéia, tosse e sibilos (KUMAR *et al.*, 2001).

Anualmente ocorrem cerca de 350.000 internações por asma no Brasil, constituindo-se na quarta causa de hospitalização pelo sistema único de saúde (SUS), 2,3 % do total, e sendo a 3ª causa entre crianças e adultos jovens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). Há registros de aumento desse número de internações entre 1993 e 1999 e indícios de que a prevalência da asma esteja aumentando em todo o mundo, inclusive no Brasil (GERGEN e MULLALLY, 1988; FIORI e FRISTCHER, 2001).

Em 1996, os custos do SUS com internação por asma foram de 76 milhões de reais, 2,8 % do gasto total anual e o 3º maior valor gasto com uma doença. Já 2007 foram registradas 273.205 internações por asma no Brasil, o que equivale a 2,41 % das internações totais, só ficando atrás das pneumonias e insuficiência cardíaca congestiva. Estudo multicêntrico (International Study for Asthma and Allergies in Childhood - ISAAC) realizado em 56 países mostrou uma variabilidade de asma ativa de

1,6 % a 36,8 %, estando o Brasil em 8º lugar, com uma prevalência média de 20 % (LAZARUS *et al.*, 2001).

Na inflamação brônquica causada pela asma crônica, as células inflamatórias através da liberação de inúmeros mediadores, tais como histamina, leucotrienos, espécies reativas do oxigênio (ERO), e citocinas, causam alterações na permeabilidade vascular, lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico e no tônus das vias aéreas, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso traqueal (KUMAR *et al.*, 2001; HOLGATE *et al.*, 2000).

As ERO estão entre os inúmeros mediadores liberados em processos inflamatórios das vias aéreas e possuem um papel importante na patogênese da asma, DPOC e a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), apresentando como sintomatologia a alteração na contração e relaxamento do músculo liso traqueal (RAHMAN e MACNEE, 2000; HENRICKS e NIJKAMP, 2001). Dessa forma, tem sido expressiva a dedicação de pesquisadores em elucidar as características biofísicas e bioquímicas do músculo liso traqueal, visando uma melhor compreensão de como se dá a sua alteração na asma (STEPHEN *et al.*, 2002; WEBB, 2003).

### Conceito

Os RL podem ser definidos como qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; MAIER e CHAN, 2002; HORTON, 2003). Podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou, a partir da clivagem de uma ligação covalente, quando cada um dos átomos envolvidos ficam com um elétron. Essa clivagem homolítica que forma os RL é uma situação energeticamente instável e confere alta reatividade a essas espécies (HALLIWELL, 2001).

Os efeitos tóxicos relacionados ao oxigênio (O<sub>2</sub>) já são conhecidos desde o final de século XIX, mesmo assim, a identificação dos radicais livres (RL) causadores desta toxicidade somente foi possível há cerca de 50 anos, quando Denham Harman lançou sua teoria sobre o envolvimento destes RL em processos de mutagênese, câncer e envelhecimento. Estas pesquisas foram aprimoradas com a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD), em 1969 (MENEHINI, 1987).

Exceto pelos organismos anaeróbios e organismos unicelulares tolerantes ao O<sub>2</sub>, todos os animais, plantas e bactérias requerem o O<sub>2</sub> para produção eficiente de energia. Normalmente, em torno de 95 a 98 % do O<sub>2</sub> utilizado pelos organismos aeróbios é reduzido a água na cadeia respiratória no processo conhecido como fosforilação oxidativa (HALLIWELL, 2001). As fontes que cedem cátions de hidrogênio e os elétrons para essa reação são, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q. Todavia, restam de 2 a 5 % do O<sub>2</sub> que será reduzido univalentemente, produzindo intermediários altamente reativos, denominados ERO, que algumas vezes constituem os RL (HALLIWELL, 2001).

Os principais sistemas enzimáticos que catalisam a redução do O<sub>2</sub> são as ciclooxigenases (COX), lipooxigenases, xantina oxidase, aldeído oxigenase, flavina desidrogenase e peroxidases. Essa redução também ocorre em reações não enzimáticas e em reações de auto-oxidação como as que ocorrem com catecolaminas, flavinas e ferridoxinas, além de reações catalisadas por ferro (Fe<sup>2+</sup>), cobre (Cu<sup>2+</sup>) e radiações ionizantes (GUTIERREZ, 2002).

Os RL apresentam, em geral, uma grande instabilidade e possuem um tempo de meia vida curto, reagindo rapidamente com diversos compostos, podendo atacar membranas lipídicas, proteínas e moléculas de DNA (JORDÃO JR. *et al.*, 1998). Quando reagem com um composto não-radical, outro RL pode ser formado. Portanto, a presença de um único RL pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons. As reações em cadeia podem ser finalizadas quando dois RL se encontram, uma vez que eles podem combinar seus elétrons sem par e se unir para formar uma ligação covalente (MAXWELL, 1995).

Nos organismos vivos encontram-se diversos tipos de RL, entre eles estão o radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), alcoxil ( $\text{LO}^\bullet$ ), peroxil ( $\text{LOO}^\bullet$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\bullet$ ) e a ubiseminquinona ( $\text{UqN}^\bullet$ ). O ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o oxigênio *simpleto* ( $^1\text{O}_2$ ) e o ozônio ( $\text{O}_3$ ) não são considerados RL, mas estão envolvidos em reações químicas que geram RL em organismos vivos, por isso também são importantes (HALLIWELL, 2001; HENRIQUES *et al.*, 2001; PICADA *et al.*, 2003).

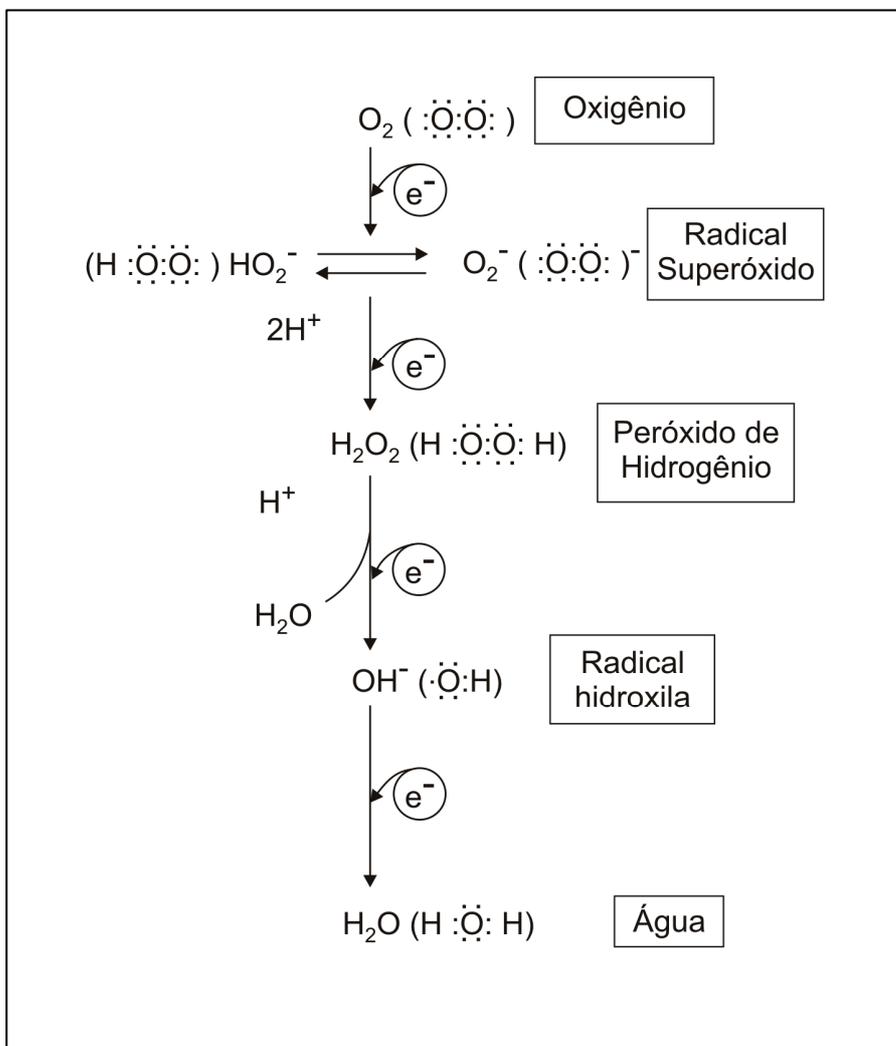
Quatro fontes parecem ser as responsáveis pela produção da grande maioria dos RL conhecidos, entre elas estão os elétrons originados na cadeia respiratória mitocondrial (principal fonte), os elétrons provenientes do sistema do citocromo  $\text{P}_{450}$  e citocromo b5 no retículo endoplasmático, das células fagocitárias e dos peroxissomas (PÔRTO, 2001).

### **Espécies reativas do oxigênio**

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $\text{O}_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Cabe à enzima citocromo oxidase mitocondrial a função de acrescentar quatro elétrons em cada molécula de oxigênio para gerar duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  (BERGENDI *et al.*, 1999). Porém, devido à sua configuração eletrônica, o  $\text{O}_2$  tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, como o  $\text{O}_2^\bullet$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\text{OH}^\bullet$  (figura 1) (BABIOR, 1997; GÜNÇİN *et*

al., 2004). Torna-se importante ressaltar que reativo não é sempre um termo apropriado uma vez que  $O_2^{\bullet}$  e o  $H_2O_2$  reagem diretamente com poucas moléculas no organismo humano, enquanto que o  $OH^{\bullet}$  pode reagir com qualquer molécula (RUNCHARD e KELLY, 1996). Cada ERO tem suas próprias características, com diferentes reatividades e tempos de meia (YU, 1994).

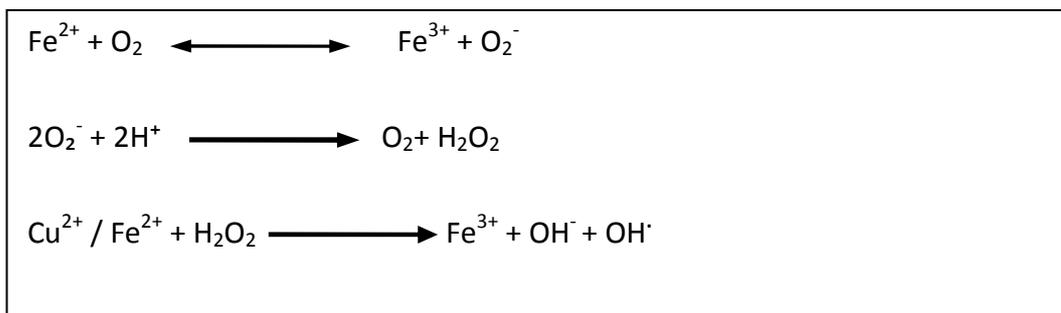
O ânion  $O_2^{\bullet}$  é o primeiro intermediário da redução do  $O_2$ , e a partir desse, serão formadas as demais ERO. Apresenta meia vida mais longa comparada ao  $OH^{\bullet}$  podendo reagir com as moléculas por mais tempo (HALLIWELL, 2001). Seus efeitos deletérios vêm da habilidade de gerar radicais secundários como  $H_2O_2$ , por dismutação espontânea e radicais extremamente tóxicos, como  $OH^{\bullet}$  (BARREIROS *et al.*, 2006).



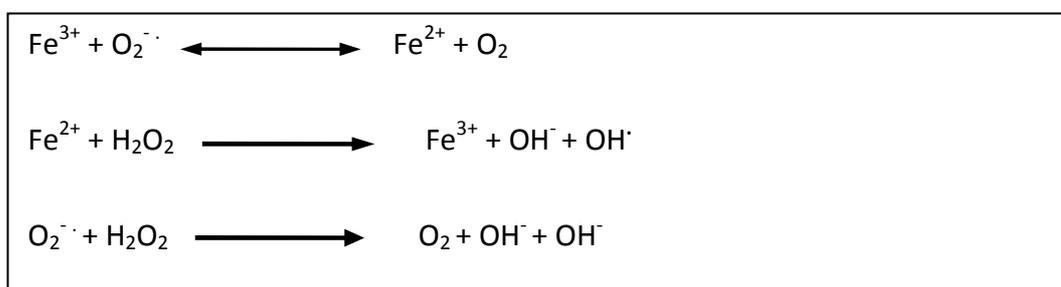
**Figura 1** - Redução tetraivalente do  $O_2$  na mitocôndria até a formação de água.

Apesar do radical  $O_2^\bullet$  não poder atacar diretamente o DNA, lipídios e proteínas (HALLIWELL, 2001), em condições elevadas o mesmo pode causar a mobilização de  $Fe^{2+}$  a partir da ferritina e também atacar o sítio ativo de diversas enzimas, causando sua inativação (TURI *et al.*, 2004). Por ser um RL e, por conseguinte, muito reativo, deve ser removido rapidamente dos tecidos pela reação da dismutação realizada pela enzima superóxido dismutase, em que dois  $O_2^\bullet$  reagem entre si, sendo um oxidado a  $O_2$  e outro reduzido a  $H_2O_2$  (BOWLER e CRAPO, 2002).

Embora  $H_2O_2$  não seja um verdadeiro RL, pode reagir com metais redox ativos como  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , como demonstrado na reação de Fenton (figura 2). O  $H_2O_2$  também poderá reagir com esses metais através da reação de Haber-Weiss (figura 3), gerando o importante radical  $OH^\bullet$  (YOSHIDA e CAMPOS, 2005). Possui um tempo de meia vida longo e grande capacidade de atravessar as membranas celulares hidrofóbicas e se difundir para o interior da célula (ANDRADE JR., 2005).



**Figura 2** - Reação de Fenton (MAIER e CHAN, 2002).



**Figura 3**-Reação de Haber-Weiss (MAIER e CHAN, 2002).

Radicais  $\text{OH}^\bullet$  são altamente reativos e capazes de atacar e danificar todas as biomoléculas por reagir com quase todas as substâncias orgânicas e são gerados sempre que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagir com íons  $\text{Cu}^{+2}$  ou  $\text{Fe}^{+2}$  (LOYD *et al.*, 1997; PIERRE e FONTECAVE, 1999; KANNO *et al.*, 2003). O  $\text{OH}^\bullet$  é um dos mais deletérios ao organismo, pois possui tempo de meia vida muito curto sendo difícil de ser seqüestrado *in vivo* e além disso, não há enzimas que catalise sua remoção. Pode ser gerado principalmente por radiação ionizante e em reação com metais de transição, a partir da reação de Fenton ou de Haber-Weiss, ou ainda pode reagir com o  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Frequentemente causa dano por retirar átomos de hidrogênio do grupo metileno dos ácidos graxos poliinsaturados e por adição nas insaturações (YOSHIDA e CAMPOS, 2005). O radical  $\text{OH}^\bullet$  é formado principalmente pela reação de Fenton, pois a reação de Haber-Weiss é bastante lenta (HALLIWELL, 2001).

O termo genérico ERO é usado para incluir não só os radicais formados pela redução monoelétrica do  $\text{O}_2$  como o radical  $\text{O}_2^\bullet$  e  $\text{OH}^\bullet$ , mas também alguns não-radicaís derivados do oxigênio, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o oxigênio simpleto ( $^1\text{O}_2$ ), o  $\text{HClO}$  e o  $\text{O}_3$  (CROSS *et al.*, 2002; HALLIWELL, 2001). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), que têm como principais representantes o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (SARKAR e BHADURI, 2001; BOWLER e CRAPO, 2002).

As ERO ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente essas espécies ativas apresentam diversas funções, como nas situações onde há necessidade de ativação do sistema imunológico como, por exemplo, os macrófagos que utilizam o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\text{O}_2^\bullet$  para destruir bactérias e outros elementos nocivos ao organismo (DELANTY e DICHTER, 1998). As ERO participam ainda de processos de sinalização celular e estão também envolvidas na síntese e regulação de algumas proteínas (HUSAIN *et al.*, 1987; DAVIES, 1994). No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais ao organismo como peroxidação dos lipídeos de membrana e agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (MIDDLETON *et al.*, 2000; COLEMAN e OLSON, 2002; BARREIROS, 2006).

## Mecanismos de defesas antioxidantes

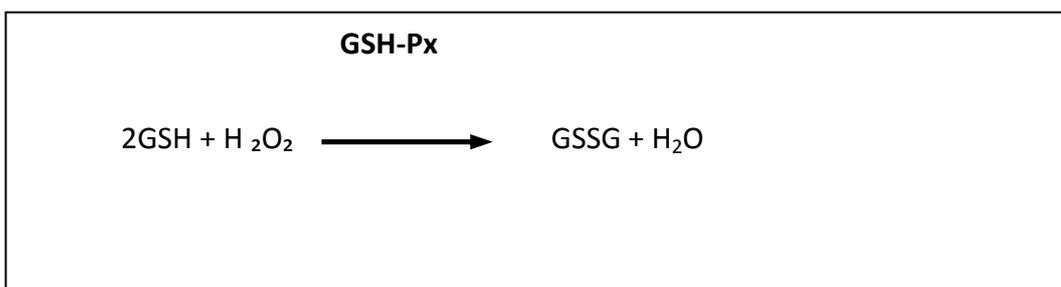
Para prevenir o dano causado pelos RL e ERO o sistema biológico desenvolveu sistemas de defesa antioxidante, que incluem antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos atuando conjuntamente na proteção celulares (CHAUDIÈRE e FERRARILIOU, 1999; SZYMONIK-LESIUK *et al.*, 2003). É considerado um agente antioxidante, qualquer substância capaz de prevenir os efeitos deletérios dos processos ou reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celular (FRAGA e OTEIZA, 2002). Pode se incluir como defesas antioxidantes os agentes que cataliticamente removem RL e outras espécies reativas, e as proteínas que diminuem a disponibilidades de agentes prooxidantes (HALLIWELL, 2001).

Podemos classificá-los em sistema antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são formados por várias enzimas das quais pode-se destacar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) glutationa peroxidase (GSH-Px) e a glutationa redutase (GSH-Rd) (TIEPPO *et al*, 2006).

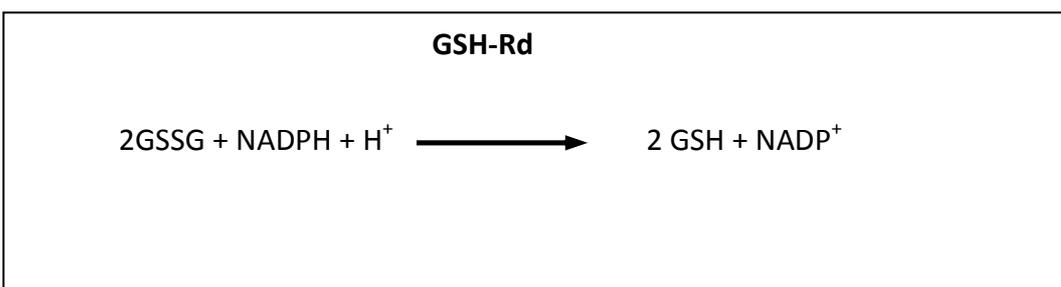
A glutationa (GSH) é um tripeptídeo, contendo cisteína e é o tiol não-protéico mais abundante nas células dos mamíferos podendo ser considerado um dos agentes mais importantes dos sistemas de defesas antioxidantes. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento tiol (-SH) presente na cisteína, atuando também como transportadora e reservatório de cisteína e participa na detoxificação de agentes químicos e eliminação de produtos da peroxidação lipídica (PL). É constituída em conjunto com duas outras enzimas, a GSH-Px e a GSH-Rd formando um sistema. A versatilidade de suas propriedades químicas faz com que sirva como um eficiente agente redutor, interagindo com componentes oxidantes como  $O_2^\bullet$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$  Após a exposição da GSH ao agente oxidante ocorre sua oxidação à glutationa oxidada (GSSG), via enzima GSH-Px, que a utiliza como substrato para eliminar peróxidos (figura 4) (ANDRADE JR *et al.*, 2005).

A recuperação da GSH (figura 5) é realizada pela enzima GSH-Rd, que dependente de nicotinamida adeninadineucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH), sendo essa uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. A GSH pode ainda proteger contra PL, reduzindo a forma oxidada da vitamina E, mantendo-a

na sua forma reduzida e funcional (YU, 1994; FERREIRA *et al.*, 1997). Variações nos níveis de GSH afetam diretamente a síntese de proteínas e DNA, e ainda situações de estresse oxidativo muito intenso, podem levar a sua perda irreversível, onde permanecerá na sua forma oxidada (UHLIG e WENDEL, 1992).

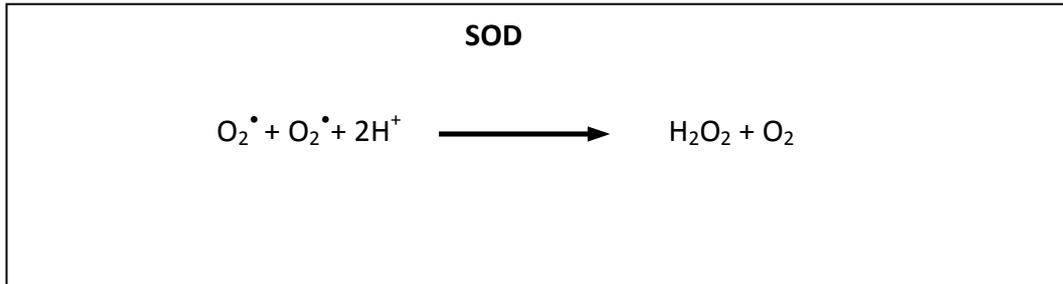


**Figura 4** - Reação da exposição da GSH ao agente oxidante.



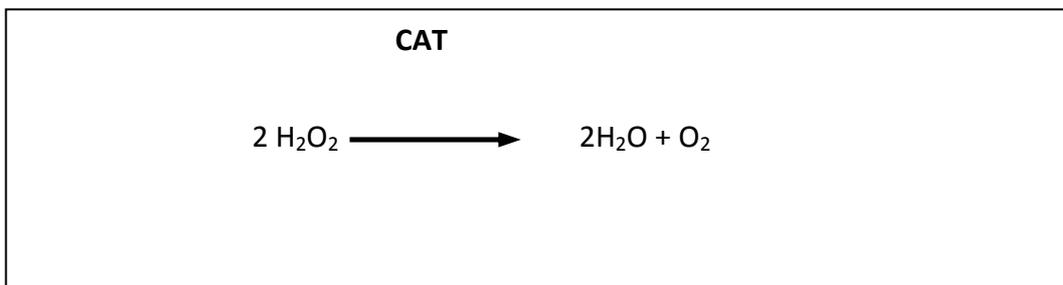
**Figura 5** - Reação de recuperação da enzima GSH.

As SOD são metaloenzimas que catalisam muito eficientemente a dismutação de dois  $\text{O}_2^\bullet$  para formar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figura 6), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (DEL MAESTRO, 1980). Estas enzimas estão amplamente distribuídas no organismo com diferentes formas, onde as que contêm  $\text{Cu}^{2+}$  e zinco são encontradas no citoplasma das células eucarióticas e são denominadas Cu/Zn-SOD. As SOD que contêm manganês são encontradas nas mitocôndrias, mais precisamente na matriz mitocondrial, e são conhecidas como Mn-SOD (HALLIWELL, 2001).



**Figura 6** - Dismutação de dois radicais  $\text{O}_2\cdot$  para formar o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A CAT é a enzima que catalisa a reação de duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , sendo altamente específica por atuar em hidroperóxidos de hidrogênio, de etila e de metila (figura 7). Essa função também pode ser realizada por a GSH-Px, onde na presença de baixos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , os peróxidos orgânicos são eliminados preferencialmente pela GSH-Px, enquanto que em altas concentrações predomina a ação da CAT (HALLIWELL, 2001; CHUNG-MAN *et al.*, 2001).



**Figura 7** - Redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  até  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ .

Assim como os mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos, existem substâncias que podem atuar, prevenindo ou inibindo a formação de RL ou ERO, evitando uma a PL na fase de propagação e reparando a membrana plasmática. São conhecidas como antioxidantes não enzimáticos como, por exemplos o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -carotenos, flavonóides e cisteína, quando presentes em altas concentrações, podem contribuir para capacidade antioxidante total do organismo (ABDALLA, 1993; GUREL *et al.*, 2005).

## **Estresse oxidativo**

Em condições normais (organismos saudáveis), a produção de espécies reativas é, em maior parte, balanceada pelos sistemas de defesa antioxidante no organismo. Quando um desequilíbrio ocorre entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante, cria-se um estado que denomina-se estresse oxidativo (CROSS *et al.*, 2002). Diante do estresse oxidativo, o organismo pode reagir de duas formas: adaptando-se ou sofrendo lesão celular. Em um caso de estresse oxidativo brando, as células suportam e respondem a essa situação com um aumento na produção de defesas antioxidantes, tentando com essa adaptação restabelecer o equilíbrio. Entretanto, um estresse oxidativo severo pode causar lesão celular e, quando muito intenso, produz danos irreversíveis que leva a morte celular, podendo ocorrer tanto por PL, necrose e por apoptose celular (HALLIWELL, 2001).

O desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os agentes oxidantes pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas, como em DNA, proteínas e lipídios (BOWLER e CRAPO, 2002). Assim, o estresse oxidativo pode ainda alterar a permeabilidade seletiva da membrana celular, provocando alterações nas bombas iônicas; provocar mutações gênicas; favorecer a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, permitindo que as mesmas acelerem os depósitos de colesterol nas paredes das artérias, favorecendo o processo artereosclerótico; formar resíduos químicos, que atuam como precursores relacionados com o processo de envelhecimento; danificar diferentes componentes da matriz extracelular e colaborar para uma eventual desorganização do equilíbrio celular (HALLIWELL, 2001).

## **Peroxidação lipídica**

A PL pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de RL em lipídeos insaturados da membrana plasmática, gerando principalmente  $L^{\bullet}$  (radical lipídico),  $LO^{\bullet}$  (radical alcóxil) e  $LOO^{\bullet}$  (radical peróxil), levando

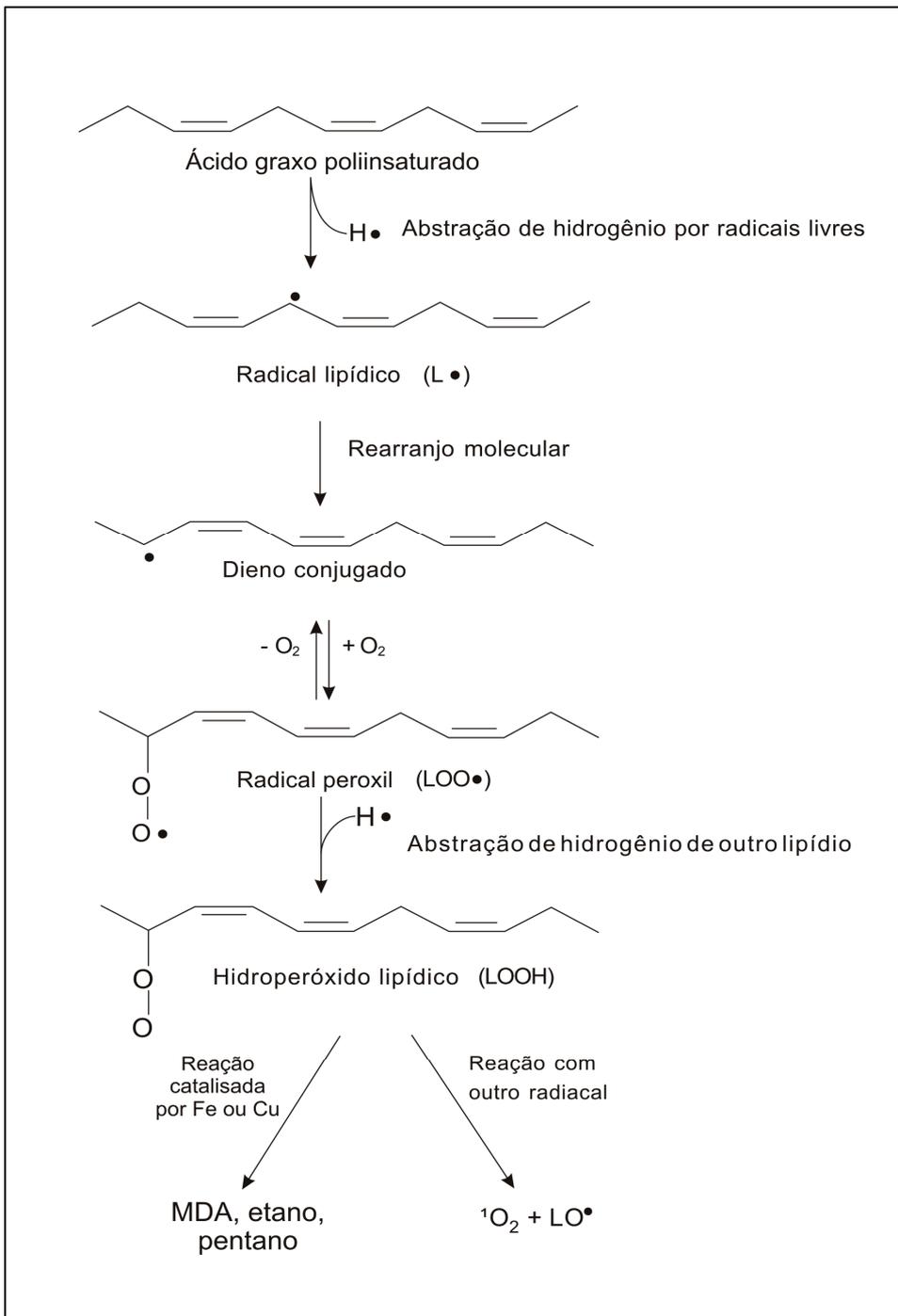
à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de trocas de metabólitos e, numa condição extrema, a morte celular (HALLIWELL, 2001).

Por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo, podendo haver modificações em suas propriedades, como alterações na estrutura e na permeabilidade (WOZNIAK *et al.*, 2002). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana plasmática é o mais atingido em decorrência da PL, que acarreta alterações na sua estrutura e na sua permeabilidade, liberando enzimas que degradam os lisossomos e rapidamente destroem a célula (HALLIWELL, 2001).

A PL é considerada a maior fonte de produtos citotóxicos, como aldeídos, produzidos da decomposição de hidroperóxidos. Os principais ácidos graxos que sofrem PL na célula são ácido linoléico, ácido araquidônico (AA) e ácido docohexanóico (ESTERBAUER *et al.*, 1981; YU, 1994). Apesar de causar danos celulares, a PL é também considerada um fator de renovação de membrana, além de ser um passo essencial na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos a partir do AA (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A PL se procede em três etapas: iniciação, propagação e terminação (figura 8). A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o ácido graxo poliinsaturado sofre ataque de um RL que é suficientemente reativo para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), formando um  $\text{L}^\bullet$ . Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL, 2001).

Em meio aeróbio, o  $\text{L}^\bullet$  se combina com o  $\text{O}_2$  formando o radical  $\text{LOO}^\bullet$ , o qual pode abstrair um hidrogênio de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical  $\text{LOO}^\bullet$  com o átomo de hidrogênio abstraído gera um lipídico hidroperóxido ( $\text{LOOH}$ ). Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical  $\text{LOO}^\bullet$ , reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a PL. Por fim, as reações de terminação têm como objetivo formar um produto estável, o que ocorre quando dois RL reagem entre si ou até o encontro com um “scavenger” de RL (antioxidante), que também produz uma ligação estável (HALLIWELL, 2001).

Os radicais  $LO^\bullet$  e  $LOO^\bullet$ , também podem: sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos, formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos tóxicos secundários da PL (derivados hidroxi-, ceto-, cetohidroxi- e epoxi-hidroxi-ácido graxo) (HSIEH e KINSELLA, 1988).



**Figura 8** - Reações em cadeia da peroxidação de lipídios.

### **Ação do Diidrocloreto de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina)**

Levando-se em consideração tudo o que foi descrito sobre RL e PL, convém fazer uma explanação sobre o diidrocloreto de 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) (AAPH) (figura 9). O AAPH é um azocomposto hidrossolúvel gerador de RL que ataca a região aquosa da membrana plasmática. Os RL gerados por decomposição térmica são de uma única espécie (SATO *et al.*, 1995) e foram identificados como sendo o ROO• (LENFANT *et al.*, 2000).

A decomposição do AAPH gera RL a uma temperatura de 37° C, no pH de 7,4, com uma taxa de produção constante sem a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como intermediário, tornando assim seu efeito independente das defesas antioxidantes do tecido. Por esse motivo, esse reagente tem sido utilizado nas pesquisas científicas para estudar a ação dos RL e as defesas antioxidantes (CABRINI *et al.*, 1995). A geração de RL pelo AAPH é dependente do tempo e da concentração (SATO *et al.*, 1995; LENFANT *et al.*, 2000). Uma vez gerados esses RL no meio extracelular, eles irão atacar a membrana plasmática causando várias alterações oxidativas em lipídeos e proteínas presentes (BARTOSZ *et al.*, 1997; LENFANT *et al.*, 2000; SATO *et al.*, 1995; ZOU *et al.*, 2001).

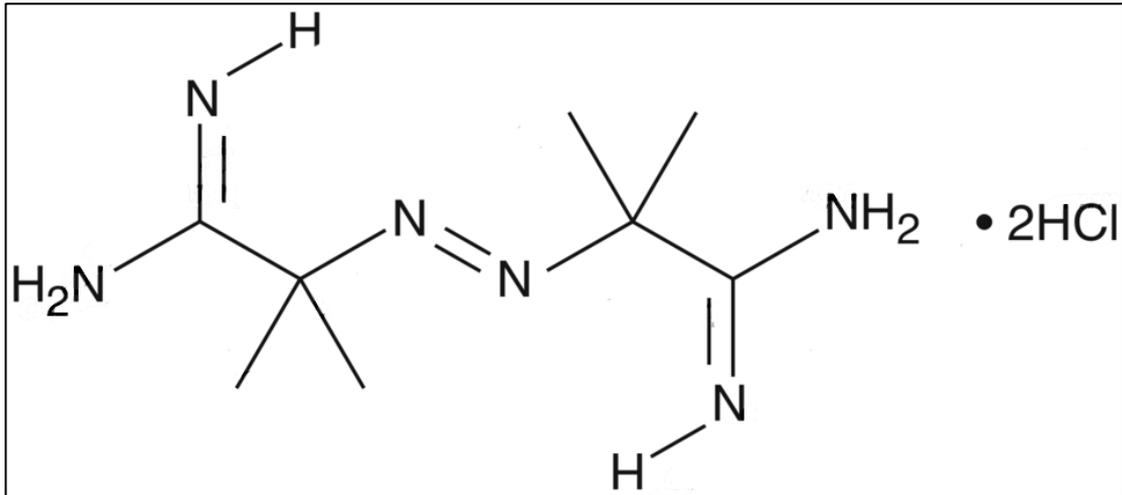
Quando entra em contato com solução aquosa o AAPH rende um nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>) e dois radicais de carbono (R•). Os radicais de carbono são formados em pares e reagem rapidamente com moléculas de oxigênio para produzir ROO•. Sua meia-vida é, aproximadamente, de 175 horas. Esse fato significa que a taxa de geração de radicais é praticamente constante para as primeiras horas (PELUSO *et al.*, 2002). A taxa de radicais livres (*r*) gerada pelo AAPH, na temperatura de 37° C é dado pela seguinte equação (KAMAYA *et al.*, 1986 ; PELUSO *et al.*, 2002):

$$r = 1.36 \times 10^{-6} [\text{AAPH}] \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Onde a concentração de AAPH é dada em moles. Essa taxa de geração de radicais é diretamente proporcional à concentração de AAPH. A quantidade total de RL formados (*TAR*) é calculada a partir da equação (KAMAYA *et al.*, 1986; PELUSO *et al.*, 2002):

$$TAR = 1,36 \times 10^{-6} [AAPH] t$$

Onde  $t$  é tempo é expresso em segundos e a concentração do AAPH é dada em moles.



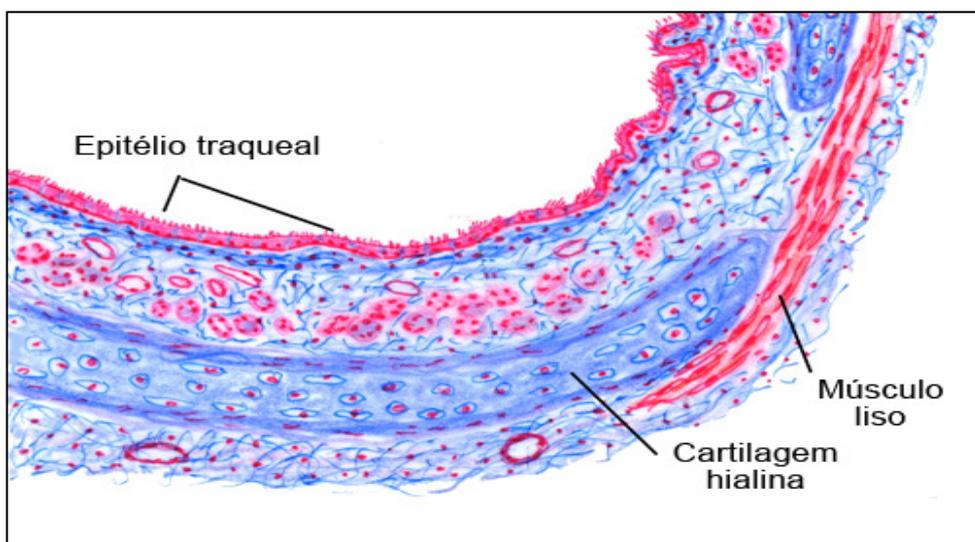
**Figura 9** - Fórmula química do dihidrocloro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH).

## MÚSCULO LISO TRAQUEAL

### Anatomia e fisiologia

A traquéia possui um número variável de anéis cartilagosos do tipo hialino em forma de C, cujas extremidades livres estão voltadas para a região dorsal, aonde não possui cartilagem, apresentando feixes musculares que estão distribuídos tanto entre os anéis cartilagosos bem como na sua porção dorsal. A parede traqueal é revestida por três camadas principais de tecido: a mucosa, a submucosa e a adventícia. O principal tipo de célula da mucosa é o epitélio ciliado, pseudo-estratificado formado principalmente pelas células caliciformes e células ciliadas que defendem o trato respiratório de partículas estranhas ao organismo, como mostra a figura 10. (BEST e TAYLOR, 1990).

A camada epitelial é composta por células que formam junções muito próximas, chegando a impedir o acesso a estruturas subjacentes e agindo como uma barreira física a irritantes (SPINA, 1998). O epitélio apresenta ainda função metabólica, já que é capaz de sintetizar substâncias biologicamente ativas como a acetilcolina (Ach), histamina, muco, citocinas, quimiocinas, prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO) (BOUSHEY *et al.*, 1980; FOLKERTS e NIJKAMP, 1998).



**Figura 10** - Desenho ilustrativo mostrando o epitélio traqueal, o músculo liso traqueal e a cartilagem hialina em forma de C.

## Sinalização pelo cálcio

O processo de contração da célula muscular lisa traqueal é iniciado pelo aumento na  $[Ca^{+2}]_i$ , que pode ocorrer através de vários mensageiros e canais iônicos (SOMLYO e SOMLYO, 1968). Os canais de  $Ca^{2+}$  são responsáveis pela entrada do  $Ca^{2+}$  na célula em resposta à sinalização da membrana e podem ser classificados em canais de entrada de  $Ca^{2+}$  e canais de liberação  $Ca^{2+}$ . A primeira classe subdivide-se em canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes (VOCs), que são ativados por despolarização da membrana através de estímulos químicos ou elétricos; canais  $Ca^{2+}$  operados por receptor (ROCs), que envolvem a ativação de receptores e estão associados a uma mínima ou inexistente despolarização da membrana. A segunda categoria inclui os canais dependentes de receptores para o trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e para rianodina, presentes na membrana plasmática do retículo sarcoplasmático (SOMLYO e SOMLYO, 1968).

A entrada de quantidades variáveis de  $Ca^{2+}$  para o interior da célula muscular lisa cria contrações cuja força é graduada de acordo com a intensidade do sinal de  $Ca^{2+}$  (WILLIAMS e FAY, 1986). O influxo de  $Ca^{2+}$ , a partir do fluido extracelular inicia a liberação de  $Ca^{2+}$  a partir do retículo sarcoplasmático no processo conhecido como liberação de  $Ca^{2+}$  induzido pelo  $Ca^{2+}$  (LCIC). Entretanto, desde que estoques de  $Ca^{2+}$  no interior da célula do músculo liso sejam limitados, contrações mantidas são dependentes do influxo continuado de  $Ca^{2+}$  do fluido extracelular (CARL *et al.*, 1996).

## Eventos moleculares da contração

A contração do músculo liso é iniciada quando um estímulo (elétrico ou químico) abre canais de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática e/ou retículo sarcoplasmático. Íons  $Ca^{2+}$  entram no citosol da célula do músculo liso e o aumento na  $[Ca^{+2}]_i$  induz a ativação de uma proteína plasmática, a calmodulina (CaM). A CaM ativada pelo  $Ca^{+2}$  forma um complexo com esse íon ( $Ca^{+2}$ -CaM) que, posteriormente, irá ativar a enzima cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), formando o complexo  $Ca^{2+}$ -CaM-MLCK. O

complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-MLCK, fosforila a miosina de cadeia leve (MCL20) que ativará a atividade ATPase da miosina, permitindo sua fixação ao filamento de actina, promovendo o ciclo das pontes cruzadas e produzindo, deste modo, a contração muscular (WILLIAMS e FAY, 1986, ALLEN e WALSH 1994).

No entanto, a contração do músculo liso da traquéia também pode ocorrer sem que haja uma elevação na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . O processo contrátil pode ser deflagrado pelo aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Apesar de o mecanismo mais amplamente aceito, em termos de regulação da contração do músculo liso, ser o da ativação da MLCK dependente da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , evidências sugerem que esta relação é variável e que alguns estímulos podem ativar a MLCK independente da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (FENG *et al.*, 1990).

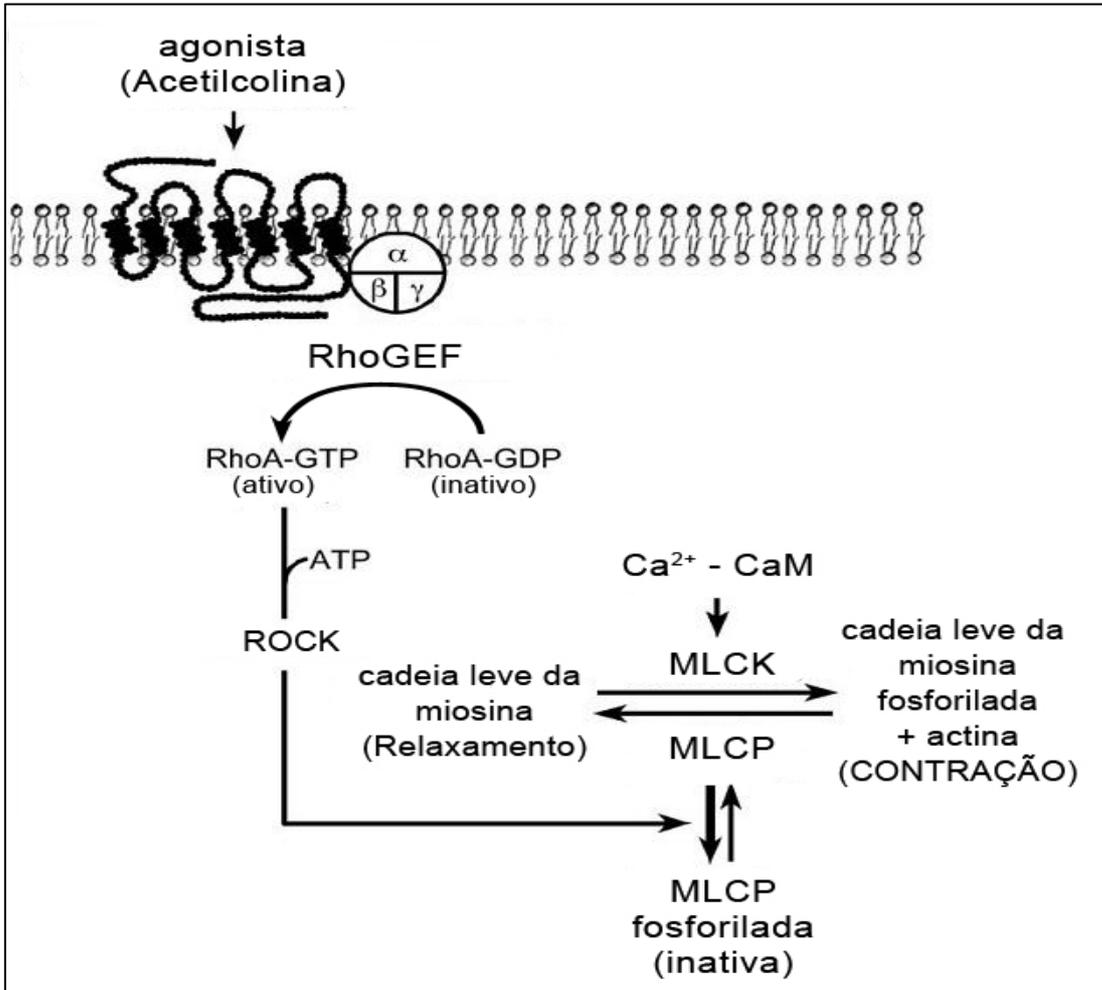
A atividade ATPásica da miosina do músculo liso é modulada pela fosforilação da MCL20 pela MLCK e, em adição, o estado de fosforilação da MCL20 também é regulado pela enzima fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), que retira o fosfato de alta energia da MCL20. Quando a MCL20 é desfosforilada pela MLCP, a atividade ATPásica e a contração são inibidas. Assim, contrações de músculo liso são primariamente controladas através do processo regulatório ligado à miosina (HAI e MURPHY, 1989). Portanto, a fosforilação da MCL20 é determinada por um balanço na ativação da MLCK e MLCP, que remove o fosfato de alta energia da MCL20 para promover o relaxamento do músculo liso traqueal (SOMLYO e SOMLYO, 2003).

Pesquisas demonstraram que a proteína RhoA-GTP, presente na membrana plasmática do músculo liso, e seu efetor Rho cinase (ROCK), estão envolvidas na sensibilização das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (KIMURA *et al.*, 1996). A RhoA-GTP, é uma pequena proteína G regulatória, que cicla entre os estados ativo e inativo através da ligação de um GTP ou GDP, respectivamente. Esta troca é realizada por intermédio dos fatores de troca de nucleotídeo de guanina (GEFs) que ativam essas GTPases, enquanto que proteínas ativadoras da atividade GTPásica de Rho (GAPs) e inibidores da dissociação dos nucleotídeos de guanina (GDIs) inibem a troca de GDP por GTP (figuras 11 e 12) (VAN AELST e D´SOUZA-SCHOREY, 1997; BOS *et al.*, 2007).

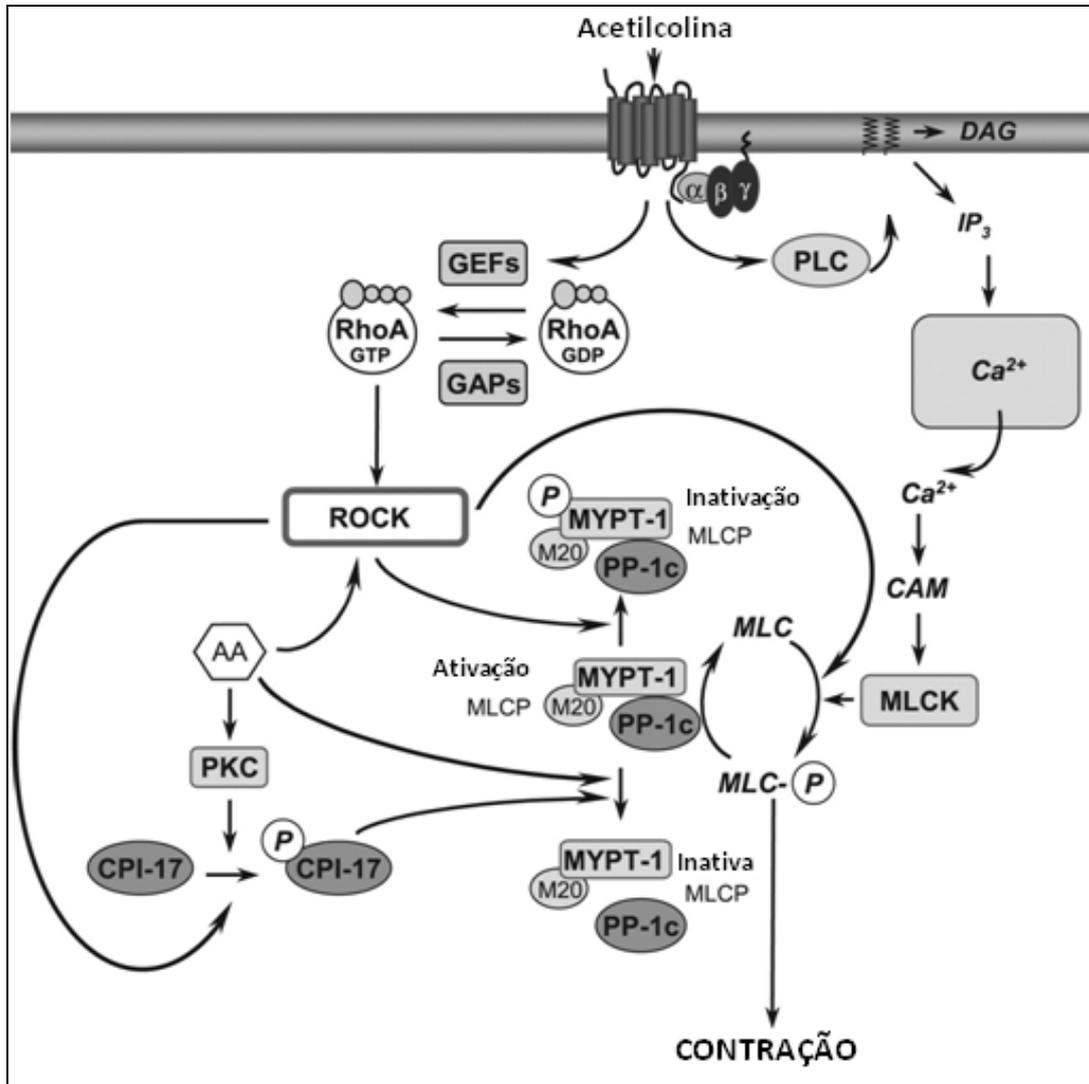
Estudos anteriores demonstraram que a ROCK é altamente expressa nas células do músculo liso traqueal (FUKATA, 2001; RIENTO e RIDLEY, 2003) e quando ativada,

fosforila a subunidade MYPT1 da MLCP inibindo a atividade catalítica desta subunidade e assim, contribuindo para a manutenção da contração do músculo liso (KIMURA *et al.*, 1996). Dessa forma, a ROCK altera o equilíbrio entre a ativação da MLCK e MLCP, inativando MLCP, resultando em um aumento nos níveis de fosforilação MCL20 que, por sua vez, manterá ou acentuará a contração do músculo liso traqueal a uma dada fixa  $[Ca^{2+}]_i$ . O mecanismo de sensibilização ao  $Ca^{2+}$  é iniciado no mesmo instante da ativação da enzima fosfolipase C (PLC) e envolve a ativação da via da ROCK, pela ligação do agonista (Ach) ao seu receptor que esta ancorado a proteína G (figura 11). (WEBB, 2003). Portanto, podemos observar que elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  é passageira, e a resposta contrátil é mantida por um mecanismo sensível ao  $Ca^{2+}$  promovido pela inibição da atividade da MLCP através da ROCK (FUKATA, 2001; WETTSCHUREK e OFFERMANN, 2002).

Outra via celular é proposta para a alteração da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $Ca^{2+}$ . A CPI-17 (proteína inibitória ativada por PKC) é uma pequena proteína que serve como substrato tanto para a ROCK como para a PKC (proteína quinase C). Quando fosforilada, a CPI-17 se liga à subunidade PP1c da MLCP e inibe a sua atividade enzimática (figura 12) (KITAZAWA *et al.*, 2000).



**Figura 11** - Sumário da cascata de sinalização Rho/ROCK (JANSEN e KILLIAN, 2006).



**Figura 12** - Figura representativa das vias de sensibilização das proteínas contráteis ao Ca<sup>2+</sup>.

### **Acoplamento eletromecânico**

O acoplamento eletromecânico é denominado assim devido à regulação da força de contração depender de alterações no potencial transmembrana (figura13) (REMBOLD, 1996). A despolarização da membrana plasmática induz a contração devido ao influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  pelos VOCs, enquanto a hiperpolarização da membrana causa relaxamento por diminuir a probabilidade de abertura destes canais (McFADZEAN e GILSON, 2002). A despolarização da membrana pode ocorrer diretamente por estimulação elétrica ou pelo aumento na concentração de potássio extracelular (HERMSMEYER *et al.*, 1998).

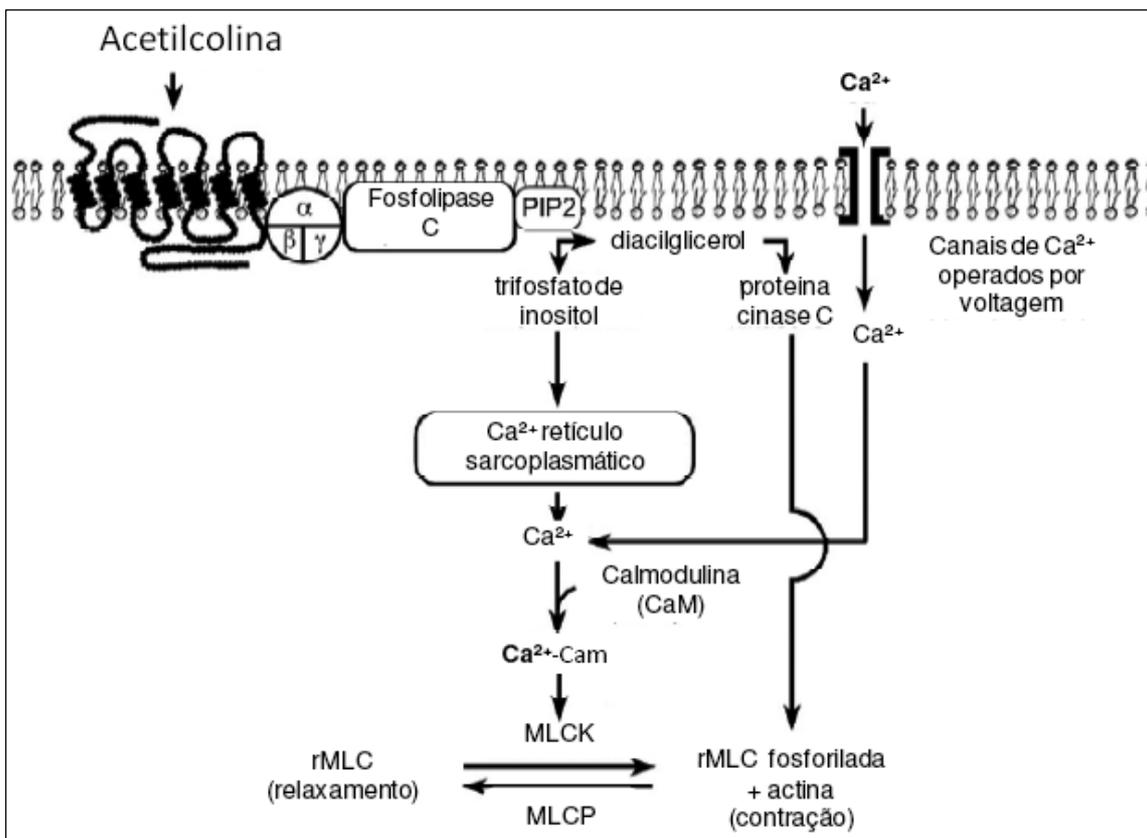
Um mecanismo proposto para a despolarização induzida por agonistas é a ativação dos canais de cloreto levando à ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L, com conseqüente aumento do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  seguido de contração muscular (CRIDDLE *et al.*, 1996).

### **Acoplamento farmacomecânico**

O acoplamento farmacomecânico refere-se à regulação da força de contração independente da despolarização, envolvendo uma variação da  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  ou aumento da sensibilidade de elementos contráteis ao  $\text{Ca}^{+2}$  (REMBOLD, 1996). A elevação do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular é devida à combinação das liberações de cálcio dos estoques intracelulares e da entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  através da membrana por canais não dependentes de voltagem, principalmente os canais de ROCs e os canais de  $\text{Ca}^{+2}$  operados por estoques (SOCs) (McFADZEAN e GILSON, 2002).

A sinalização do  $\text{Ca}^{+2}$  é iniciada com a liberação de um agonista excitatório, como a Ach, demonstrando um acoplamento farmacomecânico (figura13). Na contração muscarínica colinérgica, via proteína G, acontecem os seguintes eventos: a Ach, quando liberada, irá se ligar ao seu receptor  $\text{M}_3$  (situados na membrana plasmática do músculo liso), que sofrerá uma mudança conformacional expondo seu sítio ativo de alta afinidade com a extremidade C da subunidade  $\alpha$  da proteína G. Por

sua vez, a subunidade  $\alpha$  da proteína G, irá ativar a (PLC), que irá promover a hidrólise de PIP<sub>2</sub> (bifosfato de fosfotidilinositol) em DAG (diacilglicerol) e IP<sub>3</sub>. O DAG permanece ancorado na membrana plasmática e promove a translocação da PKC da membrana para o citoplasma e sua subsequente ativação. O Ca<sup>2+</sup> que se liga a PLA<sub>2</sub> ativa sua associação com a membrana e então subsequente liberação de AA. A conversão de AA para prostaglandinas e tromboxanos é promovida pela via da COX. Por outro lado, o IP<sub>3</sub> irá se ligar a receptores de IP<sub>3</sub> localizados no retículo sarcoplasmático, que resultará na abertura de canais de Ca<sup>2+</sup> e efluxo de Ca<sup>2+</sup> para o citoplasma (MASUO *et al.*,1994).



**Figura 13** - Esquema ilustrativo da sinalização por Ca<sup>2+</sup> para contração por acoplamento eletromecânico e farmacomecânico.

## **Músculo liso traqueal e sua interação com o aumento na concentração de radicais livres**

O sistema respiratório é diretamente mais exposto ao estresse oxidativo do que os outros tecidos biológicos. Esse estresse é considerado um evento celular determinante em muitas condições patológicas, sendo a hipótese oxidativa uma das mais coerentes para explicar os mecanismos moleculares de algumas doenças (SORG, 2004).

A presença do estresse oxidativo tem sido bem documentada nas seguintes condições patológicas: aterosclerose (ESTERBAUER *et al.*, 1987), doenças degenerativas, incluindo Doença de Alzheimer (GIASSON *et al.*, 2002), esclerose lateral amiotrófica (SORG, 2004), câncer (LOO, 2003), Síndrome de Down (JOVANOVIC *et al.*, 1998), asma e DPOC (BARNES, 1990 *et al.*; HENRICKS e NIJKAMP, 2001), esclerose múltipla (HALLIWEL, 2001), doenças gastrointestinais (HEMPHILL *et al.*, 1998), artrite reumatóide (DARLINGTON e STONE, 2001) e síndrome isquemia/reperfusão (SALVEMINI *et al.*, 2002). É bem documentado que os RL e ERO estão em níveis aumentados nos processos inflamatórios das vias aéreas e possuem um papel importante na patogênese de doenças respiratórias como a asma, enfisema pulmonar, bronquite e a SARA (RAHMAN e MACNEE, 2000; HENRICKS e NIJKAMP, 2001).

A PL ocasionada pelo estresse oxidativo produz transtornos no metabolismo das células do músculo liso, incluindo aumento na  $[Ca^{2+}]_i$ , alteração no transporte iônico, alteração na permeabilidade da membrana e sua destruição (RECKMAGE *et al.*, 1989). As ERO e os RL causam ainda alterações patológicas por oxidação ou nitração de proteínas, lipídios ou DNA levando a perda da função dessas moléculas (FUJISAWA, 2005). As proteínas sofrem reações oxidativas iniciadas pelas RL e ERO, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais, contribuindo para a alteração da contratilidade do músculo liso (ALDRED e GRIFFITHS, 2004). Processos como fragmentação, agregação, além da maior suscetibilidade a proteases, exemplificam algumas das ações dos RL sobre as proteínas (YU, 1994; MARKS, *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram que em músculo liso traqueal de ratos, o  $H_2O_2$  ocasionou um aumento na  $[Ca^{+2}]_i$  por influxo de  $Ca^{+2}$  do meio externo e por liberado pelo estoques internos (BAUER *et al.*, 1997). Em músculo liso traqueal de cobaios o  $H_2O_2$  falhou em evocar contração (KATSUYUKI *et al.*, 2006). Já em outro estudo em músculo liso traqueal de caninos, o  $H_2O_2$  aumento a  $[Ca^{+2}]_i$  primariamente via liberação de  $Ca^{+2}$  dos estoques internos (JANSEN, 2000).

Um grande destaque na literatura científica tem sido dado à via da ROCK em relação ao aumento da sensibilização do  $Ca^{+2}$  no músculo liso em geral. Inibidores de ROCK são tão eficientes quanto os broncodilatadores (LIU *et al.*, 2006). Como já foi descrito, a ROCK desempenha um papel central na regulação da resposta contrátil e na sensibilidade ao  $Ca^{+2}$  da maquinaria contrátil. No entanto, pouco é conhecido sobre o envolvimento da sensibilização ao  $Ca^{+2}$  no aumento da produção de RL em músculo liso. Assim como é pouco entendido também sobre os detalhes da sua ativação e modulação. Porém sabe-se que a ROCK tem um papel chave na regulação do tônus do em músculo liso na presença de RL e ERO. Em músculo liso traqueal de ratos de cobaios o Y27632, um antagonista da ROCK, aboliu a contração evocada por RL e ERO (ITO *et al.*, 1996).

Como já foi mencionado anteriormente, durante o processo de estresse oxidativo os principais ácidos graxos que sofrem peroxidação são o ácido linoléico e o AA (ESTERBAUER *et al.*, 1987; YU, 1994). O AA, constituinte normal dos fosfolípidios da membrana plasmática, pode ser metabolizado até a formação de prostanóides pela via da COX e a leucotrienos pela via das lipooxigenases. Os prostanóides  $PGE_2$ ,  $PGI_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$  (prostaglandinas) e o tromboxano  $A_2$  constituem os produtos mais importantes da vias da COX (JANSEN, 2000). É bem determinado pela literatura científica, que as prostaglandinas participam de diversas ações metabólicas, processos fisiológicos e patológicos, vasodilatação ou vasoconstrição; hiperalgesia; contração ou relaxamento da musculatura brônquica e uterina; hipotensão; ovulação; aumento do fluxo sanguíneo renal; proteção da mucosa gástrica e inibição da secreção ácida também no estômago; resposta imunológica; regulação de atividade quimiotáxica entre outras (JANSEN, 2000).

Atualmente, é bem estabelecido pela literatura científica que os RL e as ERO podem causar a metabolização não-enzimática do AA, produzindo um endoperóxido intermediário no meio intracelular, que será o substrato para a síntese dos diferentes tipos de prostaglandinas e isoprostanóides (iPs). Os iPs é uma família de isômeros dos prostanóides e são produzidos durante a PL por ação dos RL e ERO. Existem várias possíveis estruturas de iPs derivados do AA que são produzidos *in vivo* por mecanismo envolvendo RL ou ERO (JANSEN, 2000).

Há uma longa e crescente lista de estados patológicos e condições fisiopatológicas, associadas aos RL e ERO, que estão intimamente relacionadas com o aumento da concentração dos níveis iPs nas células de organismos vivos (JANSEN, 2000). Os níveis de iPs e seus metabólitos estão elevados no plasma sanguíneos, fluido broncoalveolar e/ou amostras de tecidos de fumantes (BARRY *et al.*, 1995); pacientes com asma (CIABATTONI *et al.*, 1999) e DPOC (CIABATTONI *et al.*, 2005). Em diversos estudos científicos essas substâncias evocaram contração em músculo liso, incluindo as artérias aorta (KROMER, 1998; JIN *et al.*, 2007), carótida (BRUCE *et al.*, 2008), coronárias (BECKER e MOBERT *et al.*, 1997) e pulmonar (JOHN e VALENTIN, 1997). Já em músculo liso traqueal, os prostanóides evocaram tanto broncoconstrição (KANG *et al.*, 1993) bem como broncodilatação (PRASAD e GUPTA, 2002; JANSEN *et al.*, 2000).

## RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

---

O mecanismo contrátil do músculo liso traqueal é de grande importância para o conhecimento dos papéis fisiológicos e fisiopatológicos do mesmo. Por esse motivo, a contração muscular vem tendo há muitos anos um papel de destaque em vários estudos científicos.

O comportamento patológico do músculo liso, constituinte da maioria dos sistemas fisiológicos, como vasos sanguíneos, trato gastrointestinal e vias aéreas, está relacionado a uma série de patologias, incluindo hipertensão e asma (JANSSEN, 2006). O quadro clínico dessas patologias, que apresentam grande impacto social e econômico (GRAHAM, 1990), está intimamente relacionado com as alterações da contratilidade e relaxamento do músculo liso. Dessa forma, tem sido expressiva a dedicação de pesquisadores em elucidar as características biofísicas e bioquímicas do músculo liso traqueal visando uma melhor compreensão de como ocorre a sua alteração fisiológica em doenças respiratórias (JANSSE, 2006)).

Atualmente existem muitos estudos sobre os importantes papéis desempenhados por RL e ERO nos processos patológicos do músculo liso traqueal. Estudos realizados sobre a ação dos RL revelaram que eles diminuem o metabolismo da parede vascular, lesam o epitélio e o músculo liso, dilatam arteríolas, abolem a reatividade vascular e podem desencadear uma reação de PL que destruirá as membranas celulares e causará citopatias múltiplas, ocasionando a morte celular (MATHRU *et al.*, 1994).

Recentemente, foram feitos estudos envolvendo vários tipos de músculo liso relacionando a PL à geração de RL. Como no músculo liso traqueal há condições patológicas em que se associam as alterações da contratilidade com a formação de RL, torna-se relevante investigar a interação entre o efeito dos RL e modificações da contratilidade. O AAPH, um agente que na literatura é apresentado com a propriedade de ser especificamente indutor de PL, foi estudado em músculo liso de íleo de cobaio e jejuno de coelho (PELUSO *et al.*, 2002), onde alterou significativamente a contratilidade, tornando oportuno avaliar sua ação sobre o músculo liso traqueal.

A terapêutica farmacológica de muitas doenças respiratórias ainda é inadequada, seja pela eficácia deficitária, seja por relativamente alta toxicidade dos agentes terapêuticos atualmente em uso. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na contração do músculo liso traqueal e sua relação com o aumento na produção de RL, pode permitir novos tratamentos para doenças das vias aéreas e doenças associadas

Baseado nesses dados julgamos que o estudo dos efeitos do AAPH sobre a contratilidade do músculo liso traqueal, poderá constituir-se em um passo relevante para a elucidação do mecanismo de ação de RL e sua associação a patologias das vias aéreas.

## OBJETIVOS

---

### Objetivo geral

Estudar os efeitos do AAPH *in vitro* sobre músculo liso de traquéia de rato.

### Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar o efeito do AAPH sobre os acoplamentos farmacomecânico e eletromecânico no músculo liso de traquéia de ratos.
- ❖ Caracterizar o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso de traquéia de ratos.
- ❖ Avaliar a participação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes do tipo L, dos produtos da via da COX e da enzima Rho cinase durante o aumento da concentração de RL promovido pelo o AAPH, na contratilidade do músculo liso de traquéia de ratos.
- ❖ Avaliar o papel modulatório do epitélio e sua interação com os efeitos induzidos pelo AAPH em músculo liso de traquéia de ratos.
- ❖ Avaliar o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso de traquéia de ratos em meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

### Sais e fármacos

Os sais utilizados no preparo das soluções fisiológicas são de grau de pureza analítica obtidos das companhias Sigma Chemical Corporation (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany), Reagem (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Wako Chemicals (USA). As concentrações foram expressas em milimol/litro (mM) ou micromol/litro ( $\mu$ M).

O cloridrato de acetilcolina (ACh) e o ácido etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA), diidrocloreto de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH), o Y27632, a nifedipina (NIF) e a indometacina (IND) foram adquiridos da Sigma Chemical Corporation (USA).

### Soluções

A solução nutritiva de Tyrode modificada (TM ou Tyrode) teve a seguinte composição expressa em mM: NaCl=136; KCl=5,0; MgCl<sub>2</sub>=0,98; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=0,36; NaHCO<sub>3</sub>=11,9; CaCl<sub>2</sub>=2,0 e Glicose=5,5. A solução nutritiva foi mantida constantemente aerada por borbulhamento de ar, à temperatura de 37° C e o pH ajustado para 7,4.

O Y27632 foi utilizado na forma de soluções preparadas, diluídas diretamente em tyrode e dimetilssulfóxido (DMSO 0,02%) seguido de agitação em aparelho, vortex mixers. A solução isenta de cálcio ( $\emptyset$ Ca<sup>2+</sup>) foi produzida com a omissão do CaCl<sub>2</sub> da solução de tyrode e adição de 0,2 mM de EGTA.

### Animais

Neste estudo os animais utilizados foram ratos (*Ratus norvegicus*), adultos, machos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 300 gramas, mantidos com acesso a água e ração, "Ad libitum", provenientes do Biotério Central da Universidade Federal

do Ceará (UFC). Os animais foram tratados seguindo as recomendações de manuseio bioético do Guia Internacional de Princípios para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, Suíça, e do livro “Princípios éticos na experimentação animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Brasil.

### **Preparação tecidual e mensuração da atividade contrátil**

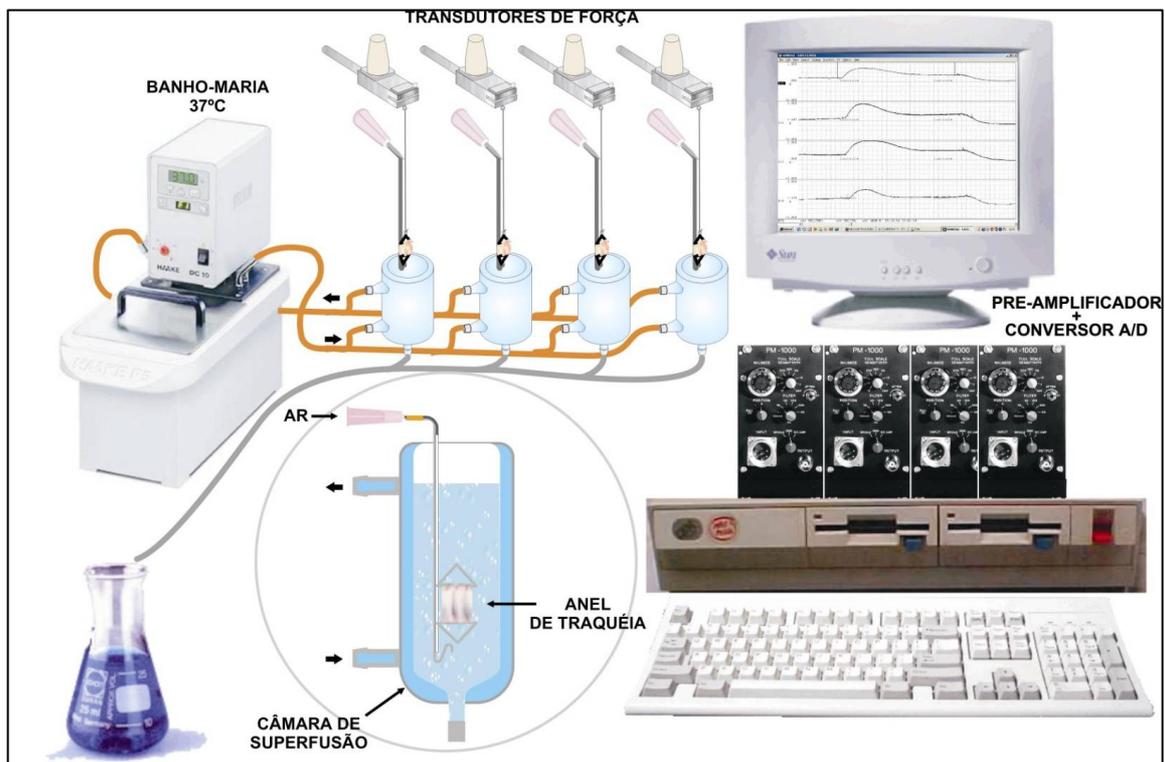
Os animais foram sacrificados por concussão cervical. Em seguida foi realizada a abertura da face ventral do pescoço por uma incisão longitudinal da pele e afastamento das glândulas e dos músculos para a exposição e a remoção da traquéia. A traquéia retirada foi transferida para uma placa de *Petri* com solução de tyrode possibilitando assim, a eliminação dos tecidos anexos e posterior secção de segmentos transversos circulares (contendo de 4 a 5 anéis de cartilagem) de 4 - 5 mm de comprimento.

Foram realizados experimentos onde manuseamos cuidadosamente a traquéia para preservar o epitélio e em outros experimentos foram realizados sem a preservação do epitélio, que foi obtido através da inserção de cotonete na superfície interna do anel da traquéia.

Os tecidos foram montados em câmaras de superfusão preenchidas com solução de tyrode a 37 °C, aerada por borbulhamento de ar e com pH ajustado para 7,4. A preparação teve uma extremidade conectada a um transdutor de força do tipo “strain gage” (Grass Instruments, modelo FT.03, Quincy, Mass, EUA), através de fixadores triangulares de aço inoxidável ligados a fio de algodão, e a outra extremidade a uma base fixa (figura 14).

As respostas musculares mecânicas (geração de força ou relaxamento) foram transformadas pelo transdutor em sinal elétrico. O transdutor foi conectado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), e este à entrada de uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada num computador IBM Pentium, cujos dados coletados foram convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ versão 1.65 (DATAQ Instrumentos, Inc. USA), para análise posterior.

Após a montagem da preparação, os segmentos isolados de traquéia foram submetidos a uma tensão de estabilização de 1 grama e mantida por um período de 1 hora, tempo necessário para a adaptação da preparação às novas condições. Ao final da estabilização, considerar-se-á que a preparação atingiu seu tônus basal de repouso.



**Figura 14** - Representação esquemática do setup de contração.

## Protocolos experimentais

Para avaliar o efeito do AAPH na contratilidade do músculo liso traqueal de ratos foram feitos os seguintes protocolos:

1. Estudo do efeito do AAPH sobre a contração induzida pela Ach e  $K^+$ , com e sem a preservação do epitélio.
2. Estudo do efeito do AAPH sobre o tônus basal com e sem a preservação do epitélio, na presença e na ausência de indometacina.
3. Estudo do efeito do AAPH sobre o tônus basal em  $\emptyset Ca^{2+}$  com a preservação do epitélio.
4. Estudo do efeito do AAPH sobre o tônus basal na presença de indometacina e nifedipina, sem a preservação do epitélio.
5. Estudo do efeito próprio do AAPH sobre o tônus basal na presença da indometacina e Y27632, sem a preservação do epitélio.
6. Estudo do efeito próprio do AAPH na presença da indometacina, nifedipina e Y27632, sem a preservação do epitélio.

Em todos os experimentos existiram preparações controles e experimentais que foram submetidas aos mesmos protocolos e situações. Com o objetivo de verificar a viabilidade e integridade do tecido traqueal, em todos os protocolos experimentais foi evocada contrações subseqüentes por 60 mM de  $K^+$  administrado direto no banho, através de solução hipertônica. Após verificar a viabilidade do tecido na preparação, todos os protocolos experimentais foram iniciados com a administração, por duas vezes e de forma não cumulativa, de Ach (10 $\mu$ M), indutora de contração, cuja amplitude foi aproximadamente de 70 a 80% da contração máxima (contração submaximal), que foi usada como padrão de contração controle. Ao final de cada protocolo realizamos 5 lavagens com tyrode em intervalo de 10 minutos, finalizando com uma contração com Ach (10  $\mu$ M) para verificar a recuperação final do tecido.

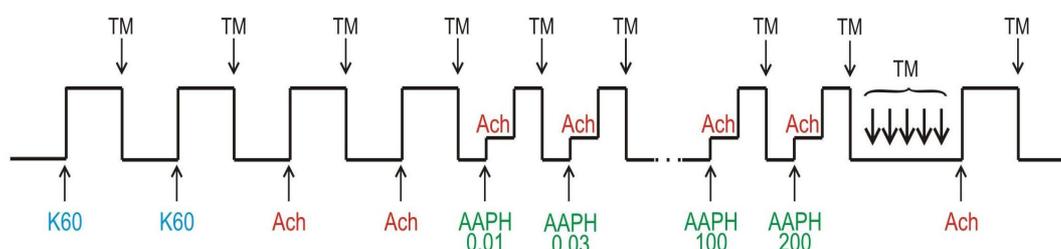
Para elucidação do papel modulatório do epitélio, utilizamos protocolos sem a preservação deste. Para comprovar a remoção do epitélio do músculo liso de traquéia de rato foi feita análise através da quantificação da amplificação das respostas contráteis à Ach nas preparações sem epitélio.

Nos protocolos em  $\emptyset\text{Ca}^{2+}$ , a solução isenta de cálcio foi produzida com a omissão do  $\text{CaCl}_2$  da solução de Tyrode e adição de 0,2 mM de EGTA.

**Protocolo 1: Estudo do efeito do AAPH sobre a contração induzida pela Ach e  $\text{K}^+$ , com e sem a preservação do epitélio.**

Com o objetivo de estudar o efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico e farmacomecânico na contração do músculo liso traqueal de rato usamos o protocolo citado.

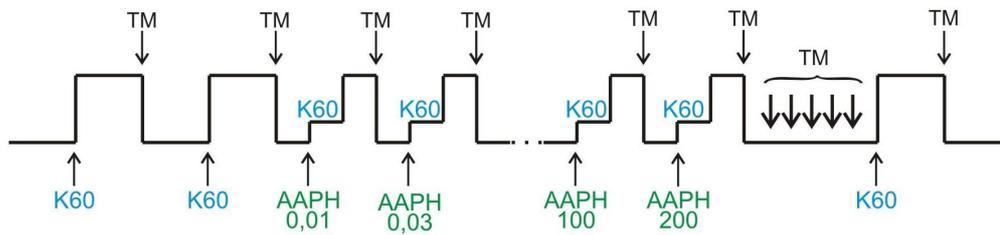
Após as contrações utilizadas como controle (contração submaximal evocada por 10  $\mu\text{M}$  de Ach) expusemos a preparação de maneira não cumulativa a uma dada concentração de AAPH (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 60, 100 e 200 mM) e, após aproximadamente 5 minutos nessa dada concentração (tempo em geral suficiente para uma eventual contração evocada pelo AAPH atingir o estado estacionário), adicionamos a concentração que promoveu a contração submaximal de Ach ao banho (figura 15). Protocolo similar foi realizado, porém sem a preservação do epitélio.



**Figura 15** - Representação esquemática do protocolo 1 (com Ach).

Procedimento protocolar similar foi utilizado para a investigação do efeito do AAPH (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 60 100, 200 mM) sobre a contração evocada por  $\text{K}^+$  (figura 16). Essa contração foi induzida por uma concentração de 60 mM de  $\text{K}^+$ , cuja amplitude foi aproximadamente 60 a 80% (contração submaximal de  $\text{K}^+$ ) da contração máxima promovida pelo  $\text{K}^+$ . Nesses experimentos em que 60 mM de  $\text{K}^+$  foi utilizado,

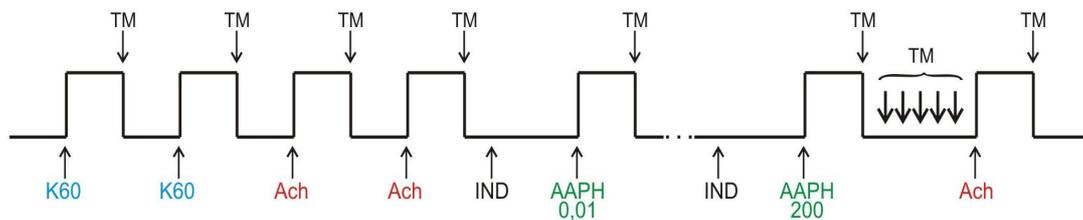
realizaram-se como controle inicial as duas contrações submaximais na ausência do AAPH, tanto em condições normais como na ausência do epitélio.



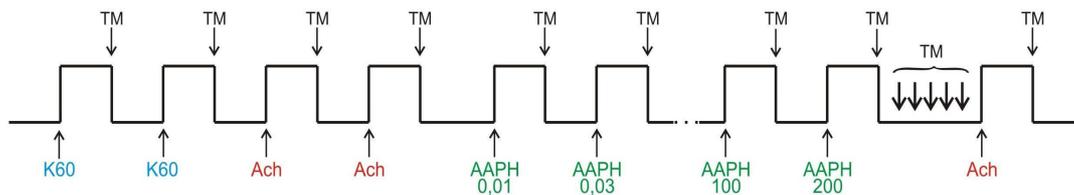
**Figura 16** - Representação esquemática do protocolo 1 (com K60).

**Protocolo 2: Estudo do efeito do AAPH sobre o tônus basal com e sem a preservação do epitélio, na presença e ausência da indometacina**

Com o objetivo de investigar a participação dos derivados da via da COX na ação do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal, usamos a IND. Após as contrações utilizadas como controle, expusemos a preparação à IND (0,2 mM) e, após aproximadamente 20 minutos (tempo necessário para o seu efeito), expusemos a preparação a uma dada concentração de AAPH (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 60, 100 e 200 mM), de maneira não cumulativa (figura 17). Protocolo similar foi realizado, porém sem a preservação do epitélio e na ausência da IND (figura 18).



**Figura 17** - Representação esquemática do protocolo 2 (com IND).

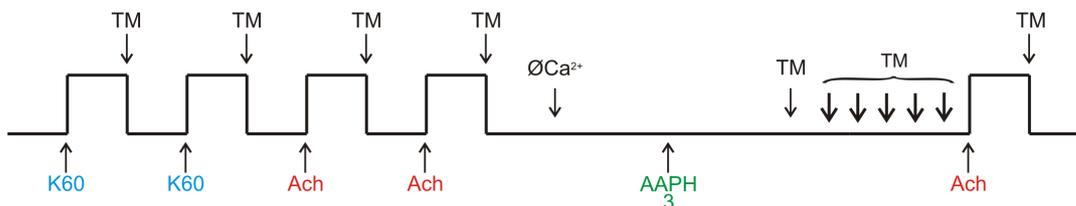


**Figura 18** - Representação esquemática do protocolo 2 (sem IND).

**Protocolo 3: Estudo do efeito do AAPH sobre o tônus basal em  $\emptyset Ca^{2+}$  com a preservação do epitélio**

Visto que investigamos, nos protocolos experimentais já realizados, o efeito próprio contraturante do AAPH sobre o tônus do músculo liso de traquéia de rato, torna-se coerente e oportuno a avaliação da contribuição do influxo do  $Ca^{2+}$  extracelular para esse efeito.

Após as contrações evocadas por 10  $\mu M$  de Ach, concentração que promoveu a contração submaximal de Ach, utilizadas como controle, expusemos a preparação em  $\emptyset Ca^{2+}$  e em seguida adicionamos ao banho a concentração de 3 mM de AAPH. Vale a pena ressaltar que escolhemos a concentração de 3 mM de AAPH por esta ter evocado maior amplitude contração como efeito próprio no tônus do músculo liso traqueal (figura 19).



**Figura 19** - Representação esquemática do protocolo 3.

#### Protocolo 4: Estudo do próprio do AAPH sobre o tônus basal na presença de indometacina e nifedipina, sem a preservação do epitélio

Pesquisas realizadas em músculo liso vascular de ratos demonstraram que a contração evocada por RL parece ter estreita relação com o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular, através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes (SOTNIKOVA, 1998). Portanto, torna-se viável e oportuno avaliarmos a participação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes do tipo L, na contração evocada por AAPH no músculo liso traqueal, sem a preservação do epitélio e na presença da IND (o que assegura que estaremos avaliando o efeito próprio do músculo liso traqueal).

Após essas contrações, utilizadas como controle e sem a preservação do epitélio, incubamos a preparação com a NIF (10  $\mu\text{M}$ ) e a IND (0,2 mM) por 20 minutos e depois expusemos a preparação à concentração de 3 mM de AAPH (figura 20).

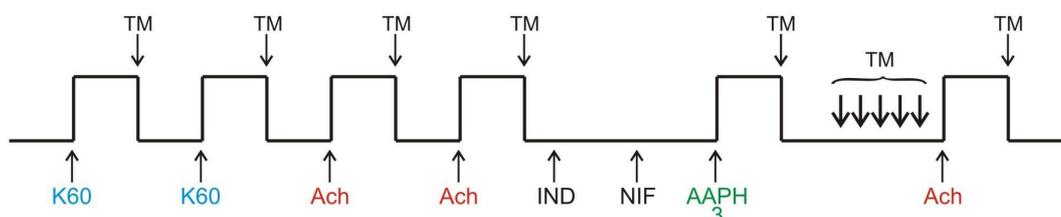


Figura 20 - Representação esquemática do protocolo 4.

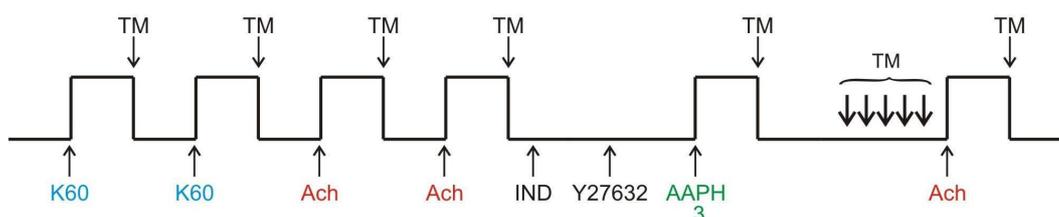
#### Protocolo 5: Estudo do efeito do AAPH sobre o tônus basal na presença de indometacina e Y27632, sem a preservação do epitélio

É bem revelado pela literatura científica que a via da enzima ROCK desempenha um papel central na regulação da sensibilidade da maquinaria contrátil ao  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo liso. No entanto, muito pouco é conhecido sobre o envolvimento da alteração dessa sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e sua interação com a ação dos RL e ERO no músculo liso traqueal. Em um estudo realizado em músculo liso traqueal de cobaias, verificou-se

que o Y27632 (antagonista da via da ROCK) na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , antagonizou completamente a contração evocada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (KATSUYUKI *et al.*, 2006).

Considerando-se que a via da ROCK está envolvida em vários processos que contribuem para a hiperresponsividade do músculo liso na presença de RL e ERO, o uso do inibidor de ROCK pode ser, claramente, uma promessa de terapia. Portanto, torna-se viável e oportuno avaliarmos a participação dessa via na contração evocada por AAPH em músculo liso traqueal de ratos. Com esse objetivo, escolhemos a concentração 3 mM de AAPH por evocar maior contração sobre o tônus do músculo liso traqueal.

Iniciamos o protocolo com a administração da concentração de Ach (10  $\mu\text{M}$ ). Após essas contrações, utilizadas como controle e sem a preservação do epitélio, incubamos a preparação com IND (0,2 mM) e Y27632 (10  $\mu\text{M}$ ) por 20 minutos. Em seguida expusemos a preparação a concentração de AAPH 3 mM (figura 21).



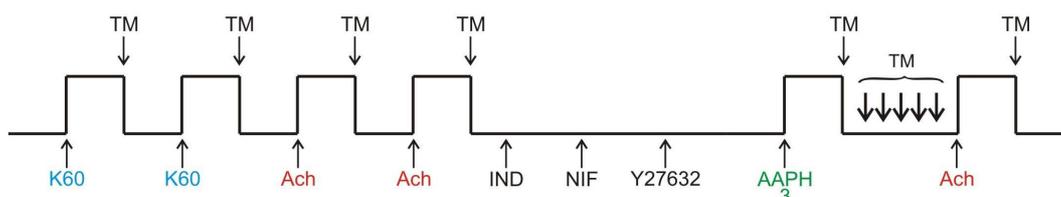
**Figura 21** - Representação esquemática do protocolo 5.

### **Protocolo 6: Estudo do efeito próprio do AAPH na presença de indometacina, nifedipina e Y27632, sem a preservação do epitélio**

Visto que investigamos, nos protocolos experimentais já realizados, observamos efeito próprio contraturante do AAPH sobre o tônus do músculo liso de traquéia de rato, torna-se coerente e oportuno a avaliação da contribuição do influxo do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, a participação dos produtos da via da COX, bem como a contribuição da via da ROCK para esse efeito. Com esse objetivo, escolhemos a

concentração 3 mM de AAPH por evocar maior contração sobre o tônus do músculo liso traqueal.

Iniciamos o protocolo com a administração da concentração de Ach (10 µM). Após essas contrações, utilizadas como controle e sem a preservação do epitélio, incubamos a preparação com IND (0,2 mM) e Y27632 (10 µM) por 20 minutos. Em seguida expusemos a preparação a concentração de AAPH 3 mM (figura 22).



**Figura 22** - Representação esquemática do protocolo 6.

### **Análise estatística**

Os resultados dos dados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n), onde n representa o número de experimentos e E.P.M. é o erro padrão da média. Os gráficos foram produzidos através do software Sigma Plot 8.0. Foi utilizado o software Sigma Stat 3.0 para a análise estatística, onde foram considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Para comparação de dois grupos foi realizado o teste *t* pareado ou não pareado; para mais de dois grupos experimentais, ANOVA seguido de técnica de contraste (testes paramétricos ou não paramétricos), conforme apropriado, respeitando-se as hipóteses de normalidade da distribuição e de homocedasticidade. As  $EC_{50}$  foram calculadas por interpolação semilogarítmica e fit sigmóide através do software Sigma Stat 3.0, sendo consideradas neste trabalho como a concentração da substância que é capaz de produzir 50% do efeito máximo (estimulatório).

## RESULTADOS

---

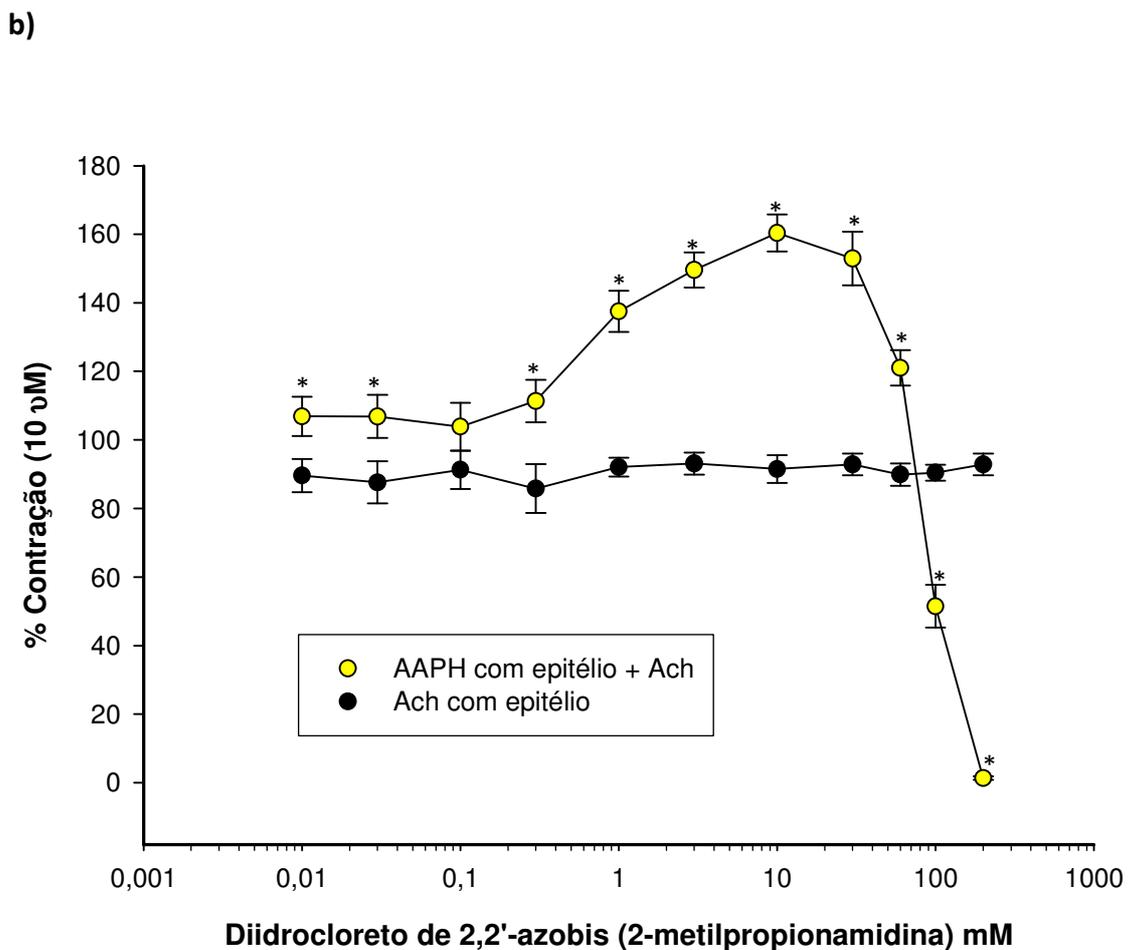
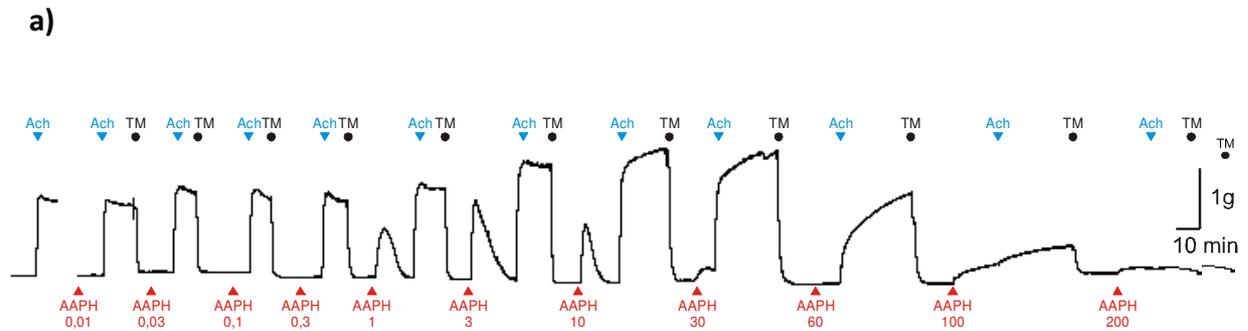
Estudamos o efeito do AAPH sobre os parâmetros contráteis do músculo liso traqueal de ratos, com o objetivo de caracterizar seus possíveis efeitos sobre o tônus basal e sobre acoplamento eletromecânico e farmacomecânico.

### **Efeito do AAPH sobre a contração induzida pela acetilcolina em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

Verificamos o efeito do AAPH sobre o acoplamento farmacomecânico em preparações traqueais com a preservação do epitélio (figura 23a e 23b; tabela 1). O AAPH produziu efeito bifásico sobre as contrações submaximais induzidas por Ach nos experimentos em que os anéis de traquéia estavam com a preservação do epitélio.

Nas concentrações 0,01, 0,03, 0,3, 1, 3, 10, 30 e 60 mM o AAPH potencializou a contração evocada por Ach, de maneira dose-dependente, que foi estatisticamente significativa quando comparada com o controle ( $p < 0,05$ ). Seu efeito potencializador foi máximo na concentração de 10 mM ( $1,2019 \pm 0,152$  g), onde apresentou uma amplitude de contração 60,36% maior quando comparada com seu controle ( $0,7295 \pm 0,066$  g) (tabela 1). A  $EC_{50}$  do seu efeito potencializador, ou seja, levando em consideração as concentrações que evocaram potencialização da contração de Ach, foi igual a  $0,8776 \pm 0,4150$  mM (tabela 2).

O AAPH apresentou também efeito inibidor, diminuindo as amplitudes de contrações nas concentrações de 100 e 200 mM, que foi significativo em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Na concentração 200 mM, o AAPH foi capaz de inibir quase totalmente a contração induzida por Ach, reduzindo para valores insignificantes ( $0,0120 \pm 0,005$  g). A  $EC_{50}$  do seu efeito inibidor, ou seja, levando em consideração as concentrações que evocaram inibição, foi igual a  $81,5562 \pm 4,284$  mM (tabela 3).



**Figura 23 - Efeito do AAPH sobre a amplitude de contração induzida pela Ach em músculo liso traqueal com preservação do epitélio. a)** Traçado ilustrativo do efeito do AAPH sobre o acoplamento farmacomecânico com a preservação do epitélio. ▼ Ach, ● lavagem com TM, ▲ concentração de AAPH. **b)** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por Ach. Os resultados estão expressos em média ± EPM (n=10). \* p<0,05 em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). A EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> foram determinadas por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%. EC<sub>50</sub> = 0,8776 ± 0,415 mM (efeito potencializador) e IC<sub>50</sub> = 81,5562 ± 4,284 mM (efeito inibidor).

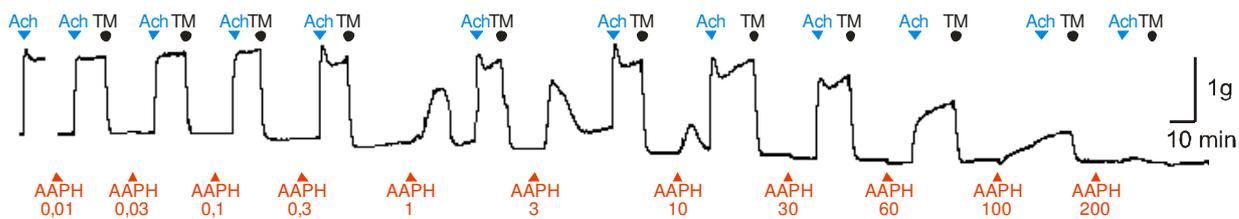
Como o epitélio é importante modulador nas contrações do músculo liso traqueal induzido por neurotransmissores e autacóides (GOLDIE *et al.*, 1990), resolvemos comparar o efeito do AAPH sobre a contração submaximal induzida pela ACh em preparações sem a preservação do epitélio (figura 24a e 24b; tabela 1).

O AAPH também promoveu a potencialização da contração colinérgica em preparação traqueal sem a preservação do epitélio, porém somente na concentração de 1 mM a contração ( $1,1433 \pm 0,148$  g) foi estatisticamente significativa quando comparada com o controle ( $p < 0,05$ ).

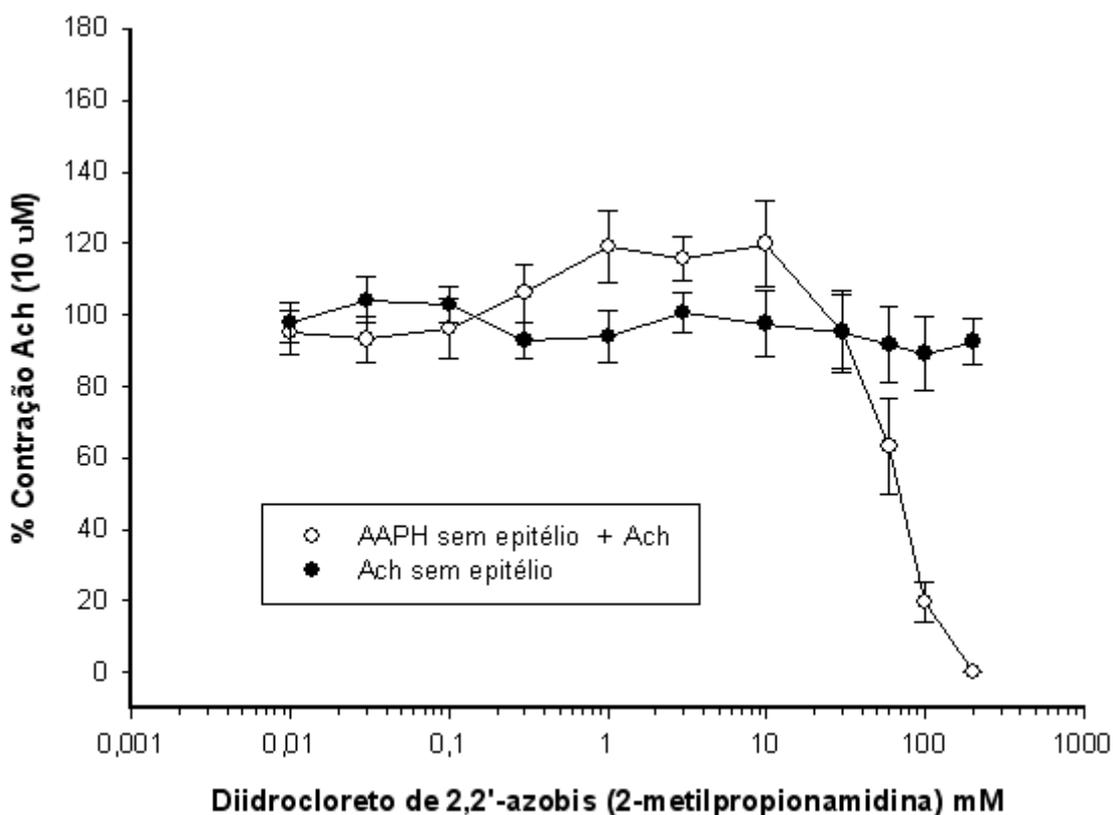
Embora não seja estatisticamente significativa, a concentração que evocou maior potencialização da contração foi de 10 mM ( $1,1223 \pm 0,252$  g). A potencialização evocada por AAPH nas concentrações de 1 e 10 mM correspondem, respectivamente, a uma contração 19,26% e 19,98% maior do que a contração do controle. A  $EC_{50}$  do seu efeito potencializador foi igual a  $0,3388 \pm 0,343$  mM (tabela 2).

O AAPH apresentou também efeito inibidor, diminuindo as amplitudes de contrações nas concentrações 60, 100 e 200 mM, que foi estatisticamente significativa quando comparada com o controle ( $p < 0,05$ ). Na concentração de 200 mM, o AAPH foi capaz de reverter quase totalmente a contração induzida por ACh, reduzindo para valores insignificantes ( $0,0012 \pm 0,016$  g). A  $EC_{50}$  do seu efeito inibidor foi igual a  $57,7786 \pm 8,607$  mM (tabela 3).

a)



b)



**Figura 24 - Efeito do AAPH sobre a amplitude de contração induzida pela Ach em músculo liso de traqueal sem preservação do epitélio. a)** Traçado ilustrativo do efeito do AAPH sobre o acoplamento farmacomecânico com a preservação do epitélio. ▼ Ach, ● lavagem com TM, ▲ concentração de AAPH. **b)** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por Ach. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM (n=9). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). A  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$  foram determinadas por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%.  $EC_{50} = 0,3388 \pm 0,343$  mM (efeito potencializador) e  $EC_{50} = 57,7786 \pm 8,607$  mM (efeito inibidor).

### **Comparação entre o efeito do AAPH sobre a contração induzida pela acetilcolina em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

Ao compararmos o efeito potencializador do AAPH sobre a contração submaximal de Ach entre preparações com e sem a preservação do epitélio, observamos diferenças estatisticamente significantes nas concentrações 3, 10, 30 e 60 mM ( $p < 0,05$ ; figura 25).

Enquanto nas preparações traqueais em que o epitélio foi preservado a maior potencialização da contração de Ach ocorreu na concentração de 10 mM ( $1,2019 \pm 0,152$  g), nas preparações em que o epitélio não foi preservado, a concentração de AAPH que evocou maior potencialização foi 1 mM ( $1,1433 \pm 0,148$  g).

Nas preparações traqueais em que o epitélio foi preservado, o AAPH (30 mM) evocou potencialização da contração de Ach ( $1,1368 \pm 0,152$  g), que foi estatisticamente significativa quando comparada com seu controle ( $0,7295 \pm 0,066$  g;  $p < 0,05$ ). Por outro lado, nas preparações em que o epitélio não foi preservado, o AAPH (30 mM) não evocou potencialização da contração de Ach ( $0,9283 \pm 0,254$  g), apresentando média de contração próxima do seu controle ( $1,0035 \pm 0,167$  g).

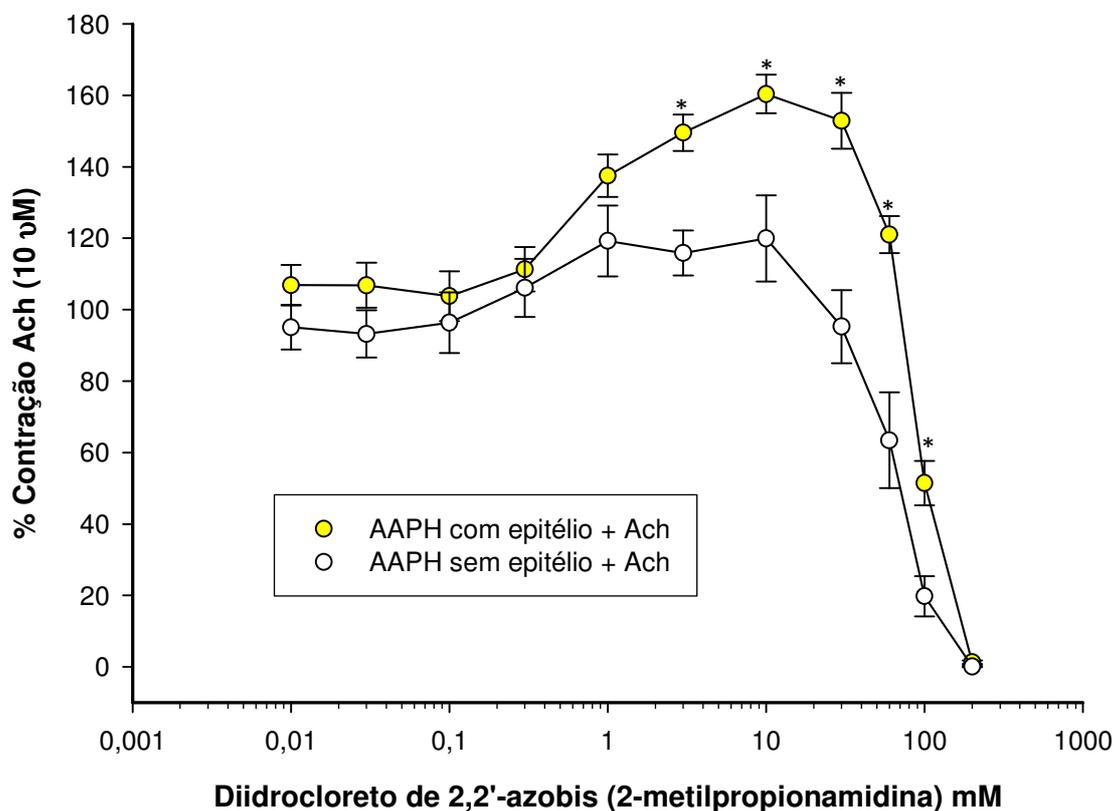
Quando comparamos as  $EC_{50}$  do efeito potencializador das preparações com a preservação do epitélio ( $0,8776 \pm 0,415$  mM) e sem a preservação do epitélio ( $0,3388 \pm 0,343$  mM), observamos que não são estatisticamente diferentes entre si (tabela 2).

Nas preparações traqueais em que o epitélio foi preservado, o efeito inibidor do AAPH foi observado nas concentrações de 100 e 200 mM, sendo estatisticamente significativo somente na concentração de 100 mM, quando comparada com preparações onde não houve a preservação do epitélio ( $p < 0,05$ ; figura 26). Por outro lado, nas preparações sem a preservação do epitélio, o efeito inibidor do AAPH sobre a contração submaximal de Ach foi observado nas concentrações 60, 100 e 200 mM (figura 24b).

Na concentração de 60 mM, em preparações em que o epitélio foi preservado, o AAPH evocou potencialização da contração de Ach ( $0,9230 \pm 0,127$  g), quando comparada com o controle ( $0,7295 \pm 0,066$  g). Enquanto em preparações sem a preservação do epitélio, 60 mM de AAPH evocou inibição da contração de Ach

(0,6168 ± 0,196 g), quando comparada com o controle (1,0035 ± 0,167 g). Quando comparamos o efeito do AAPH na concentração de 60 mM entre as preparações com e sem a preservação do epitélio, observamos que são diferentes estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Quando comparamos as  $EC_{50}$  do efeito inibidor das preparações com a preservação do epitélio (81,5562 ± 4,284 mM) e sem a preservação do epitélio (57,7786 ± 8,607), observamos que são estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ; tabela 3).

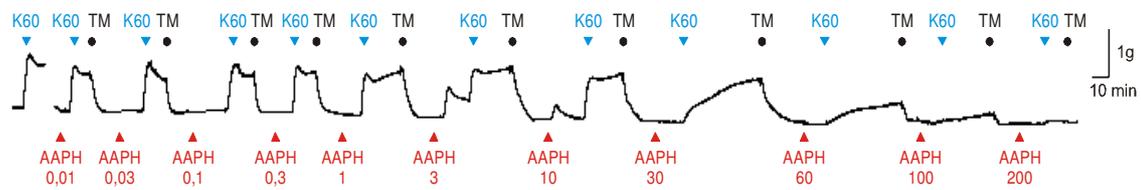


**Figura 25 - Comparação entre o efeito AAPH sobre a contração induzida pela Ach em músculo liso traqueal com (n=10) e sem a preservação do epitélio (n=9).** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por Ach. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). As  $EC_{50}$  foram determinadas por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%. Seu efeito potencializador nas preparações com e sem a preservação do epitélio apresentou  $EC_{50} = 0,8776 \pm 0,415$  mM e  $EC_{50} = 0,3388 \pm 0,343$  mM, respectivamente. Seu efeito inibidor nas preparações com e sem a preservação do epitélio apresentou  $EC_{50} = 81,5562 \pm 4,284$  mM e  $EC_{50} = 57,7786 \pm 8,607$  mM, respectivamente.

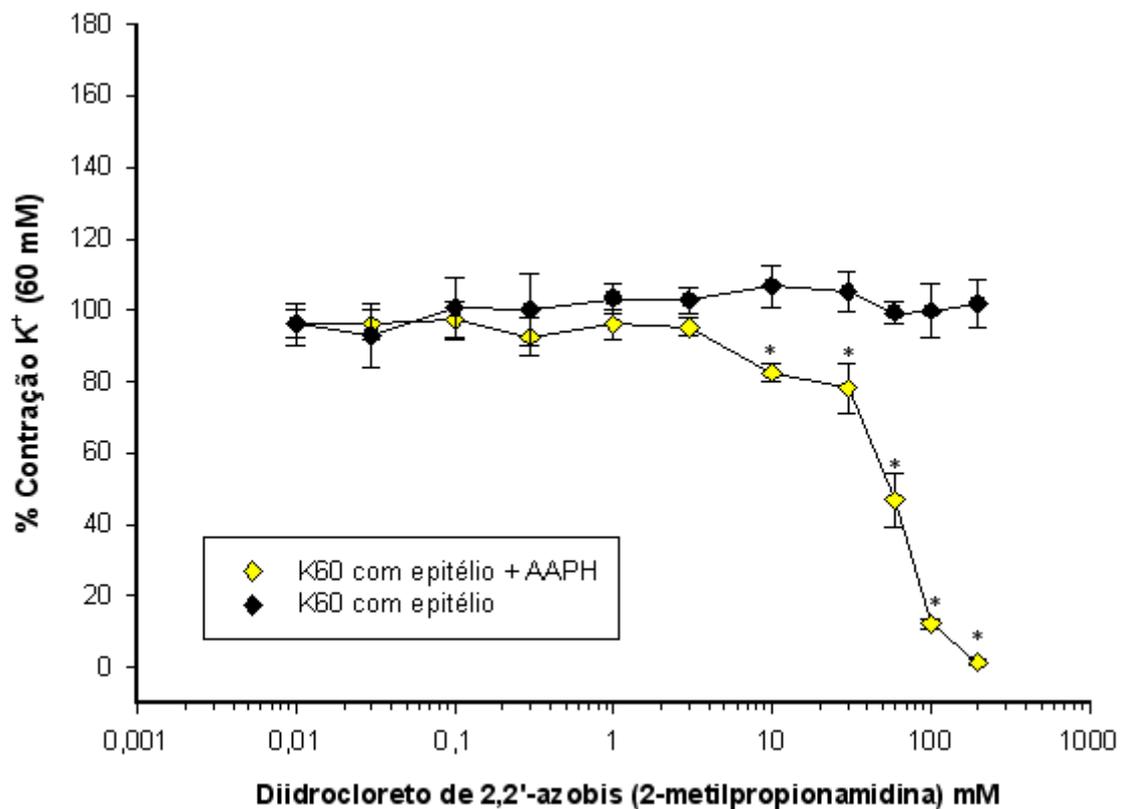
### **Efeito do AAPH sobre a contração induzida pela concentração submaximal de potássio em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

Verificamos o efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico em preparações traqueais com preservação do epitélio (figuras 26a e 26b; tabela 4). O AAPH inibiu as contrações submaximais evocada por concentração submaximal de  $K^+$  (60 mM) nos experimentos em que os anéis de traquéia estavam com o epitélio preservado. Esse efeito relaxante foi estatisticamente significativo nas concentrações 10, 30, 60, 100 e 200 mM quando comparado com o controle ( $p < 0,05$ ). Seu efeito inibitório foi máximo na concentração 200 mM e apresentou  $EC_{50}$  igual a  $57,4037 \pm 4,652$  mM (tabela 5).

a)

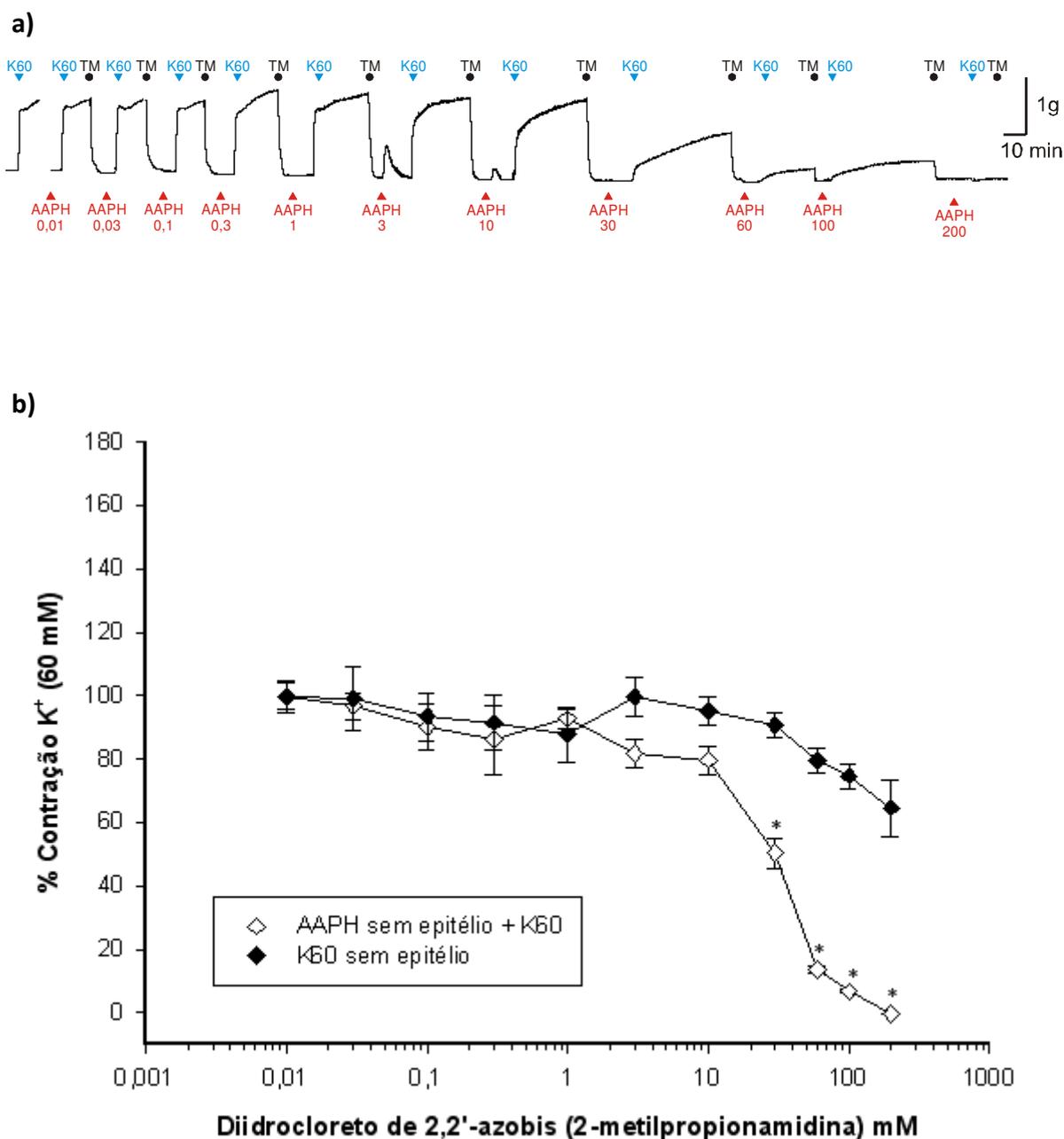


b)



**Figura 26 - Efeito inibitório do AAPH sobre a contração induzida pelo potássio em músculo liso traqueal com a preservação do epitélio.** a) Traçado ilustrativo do efeito do AAPH sobre a contração eletromecânica ( $K^+$ ) do músculo liso traqueal, com a preservação do epitélio. ▼ Potássio (60 mM), ● lavagem com TM, ▲ concentração de AAPH. b) Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por  $K^+$ . Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM (n=7). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). A  $EC_{50}$  foi determinada por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%.  $EC_{50} = 57,4037 \pm 4,652$  mM nas preparações com a preservação do epitélio.

Verificamos também o efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico em preparações traqueais sem a preservação do epitélio (figuras 27a e 27b; tabela 4). O AAPH inibiu as contrações submaximais evocada por concentração submaximal de  $K^+$  (60 mM) nos experimentos em que os anéis de traquéia estavam sem a preservação do epitélio. Esse efeito relaxante foi estatisticamente significativo nas concentrações 30, 60, 100 e 200 mM quando comparado com o controle ( $p < 0,05$ ). Seu efeito relaxante foi máximo na concentração 200 mM e apresentou  $EC_{50}$  igual a  $32,9650 \pm 2,652$  mM (tabela 5).



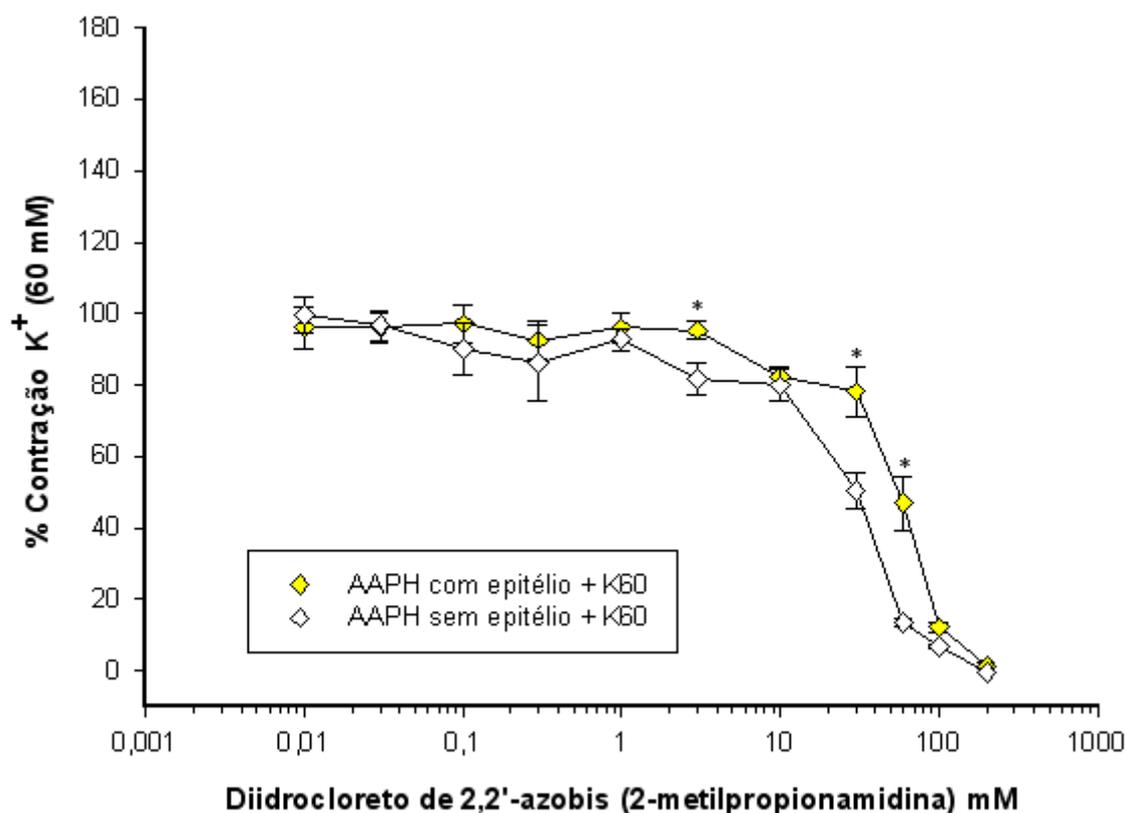
**Figura 27 - Efeito inibitório do AAPH sobre a contração induzida pelo potássio em músculo liso de traqueal sem a preservação do epitélio.** a) Traçado ilustrativo do efeito do AAPH sobre a contração eletromecânica ( $K^+$ ) do músculo liso traqueal, sem a preservação do epitélio. ▼ Potássio (60 mM), ● lavagem com TM, ▲ concentração de AAPH. b) Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por  $K^+$ . Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM ( $n=9$ ). \*  $p<0,05$  em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). A  $EC_{50}$  foi determinada por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%.  $EC_{50}= 32,9650 \pm 2,652$  mM nas preparações com a preservação do epitélio.

### **Comparação entre o efeito do AAPH sobre a contração induzida pela concentração submaximal de potássio em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

O AAPH inibiu as contrações induzidas por potássio em ambas as preparações (figura 28; tabela 4). Ao compararmos o efeito inibidor do AAPH sobre a contração eletromecânica entre preparações com e sem epitélio, observamos diferenças estatisticamente significantes nas concentrações 3, 30 e 60 mM, quando comparadas entre si ( $p < 0,05$ ).

Enquanto nas preparações com a preservação do epitélio o efeito inibidor do AAPH foi significativo na concentração a partir de 10 mM, naquelas sem a preservação do epitélio, a significância ocorreu a partir da concentração de 30 mM.

Apresentou  $EC_{50}$  igual a  $57,4037 \pm 4,652$  mM e  $EC_{50}$  igual a  $32,9650 \pm 2,652$  mM respectivamente nas preparações com e sem a preservação do epitélio, que foram estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ; tabela 5).



**Figura 28 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre a contração induzida pelo potássio em preparações traqueais com (n=7) e sem a preservação (n=9) do epitélio.** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por  $K^+$ . Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM, (n=7). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). As  $EC_{50}$  foram determinadas por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%. Nas preparações com e sem a preservação do epitélio as  $EC_{50}$  foram iguais a  $57,4037 \pm 4,652$  mM e  $32,9650 \pm 2,652$  mM, respectivamente.

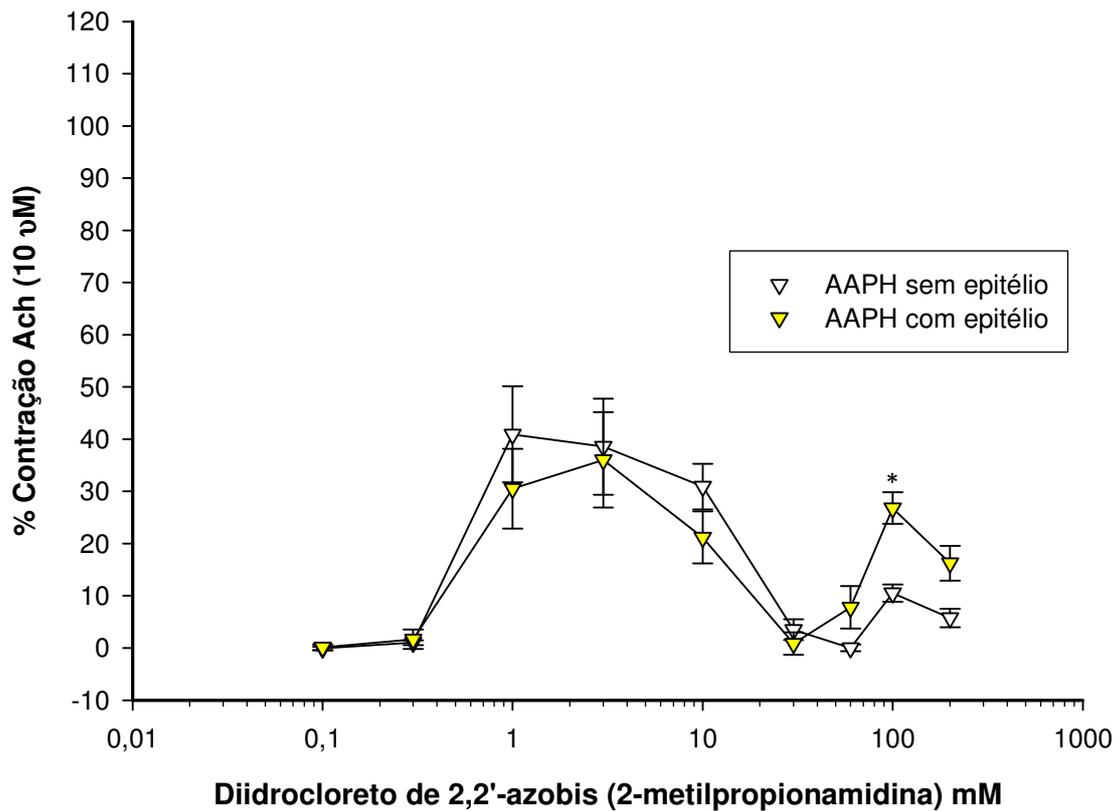
### **Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

Estudamos o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal em preparações com e sem a preservação do epitélio (figura 29; tabela 6). O AAPH apresentou efeito contraturante bifásico, de maneira dose-dependente, em preparações com a preservação do epitélio e sem a preservação do epitélio.

Nas preparações em que o epitélio foi preservado, a concentração que evocou maior contração foi em 3 mM ( $0,3183 \pm 0,111$  g). Quando comparamos com seu controle ( $0,7912 \pm 0,061$  g), verificamos que a contração evocada nessa concentração de AAPH correspondeu a 36 % da contração submaximal evocada por concentração submaximal de Ach ( $10 \mu\text{M}$ ).

Por outro lado, nas preparações em que o epitélio não foi preservado, a concentração que evocou maior contração foi em 1 mM ( $0,4212 \pm 0,086$  g). Quando comparamos com seu controle ( $0,7912 \pm 0,061$  g), verificamos que a contração evocada nessa concentração de AAPH correspondeu a 40,92 % da contração submaximal de Ach.

Somente na concentração de 100 mM o efeito contraturante sobre o tônus basal do músculo liso traqueal foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), quando comparamos as preparações com e sem a preservação do epitélio. Nessa concentração, a contração evocada por AAPH ( $0,2137 \pm 0,033$  g) correspondeu a 26,79 % da contração submaximal evocada por concentração submaximal de Ach ( $10 \mu\text{M}$ ).



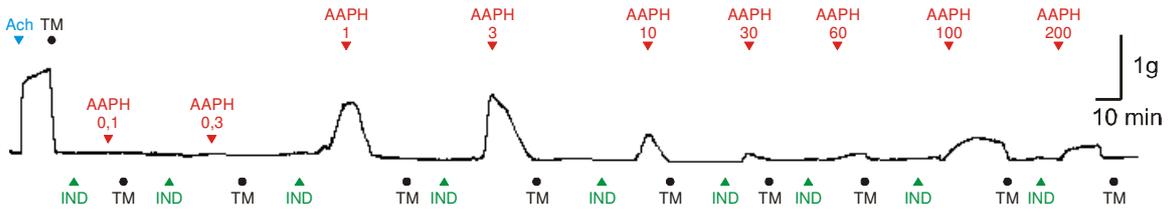
**Figura 29 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal com (n=11) e sem (n=11) a preservação do epitélio.** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre o músculo liso traqueal. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,01$  em relação as preparações com e sem a preservação do epitélio (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis).

### **Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais na presença de indometacina, com e sem a preservação do epitélio**

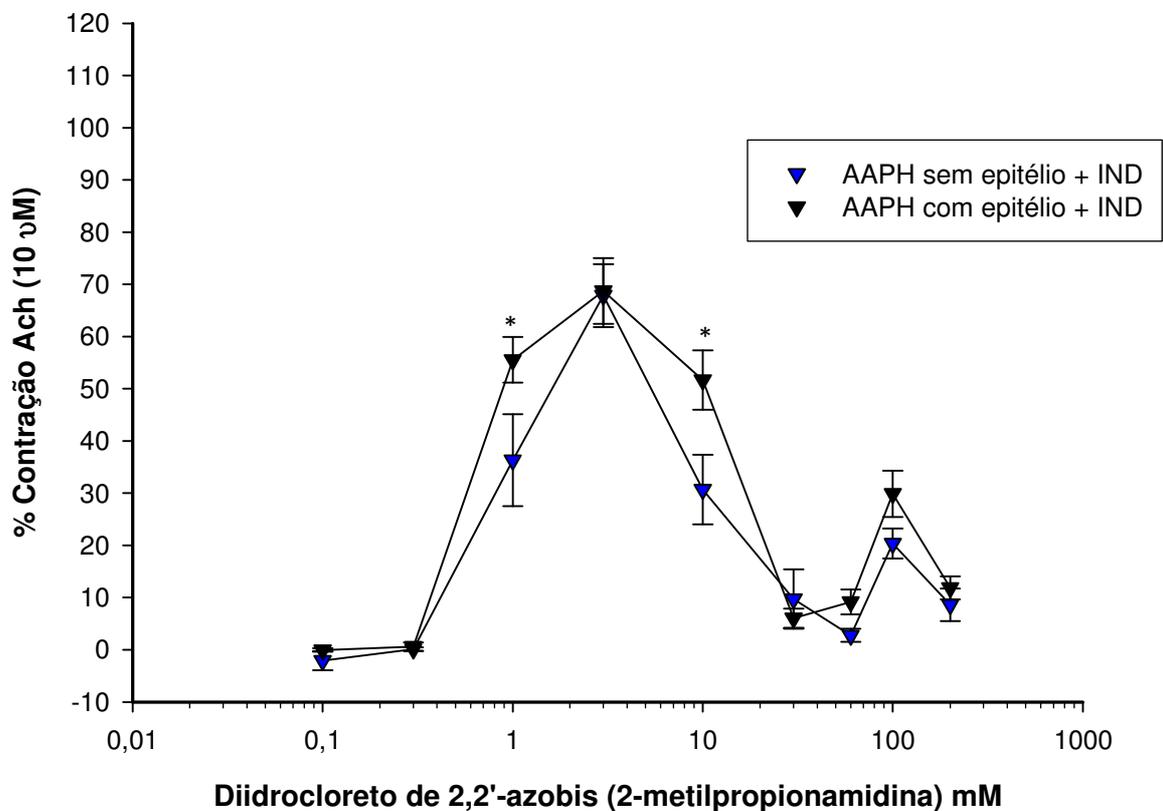
Estudamos o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal em preparações com e sem a preservação do epitélio, porém ambos na presença de IND (figura 30a e 30b; tabela 6). O AAPH também apresentou efeito contraturante bifásico, de maneira dose-dependente, em ambas as preparações. Esse efeito foi estatisticamente significativo somente nas concentrações de 1 e 10 mM, quando comparamos os experimentos com e sem a preservação do epitélio, ambos incubados com IND ( $p < 0,01$ ).

O AAPH apresentou efeito contraturante máximo na concentração de 3 mM em ambas as preparações traqueais. Nas preparações com a preservação do epitélio e na presença da IND, o AAPH (3 mM) evocou contração ( $0,9032 \pm 0,122$  g) que correspondeu a 68,71 % da contração submaximal evocada por concentração submaximal de Ach ( $1,006 \pm 0,089$  g). De forma semelhante, nas preparações sem a preservação do epitélio e na presença da IND, o AAPH (3 mM) evocou contração ( $0,8720 \pm 0,108$  g) que correspondeu a 67,84 % da contração submaximal de Ach ( $1,006 \pm 0,089$  g).

a)



b)



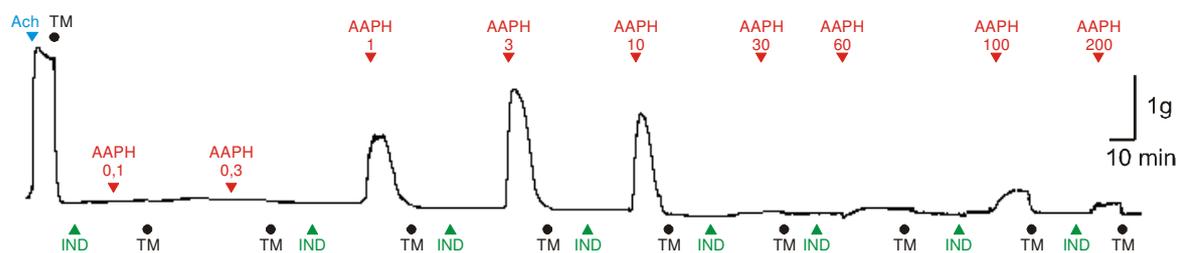
**Figura 30 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal na presença da indometacina, com preservação do epitélio (n=9) e sem a preservação do epitélio (n=11). a)** Traçado ilustrativo do efeito do AAPH sobre o tônus do músculo liso traqueal, sem a preservação do epitélio e na presença da indometacina. ▽ Ach, ● lavagem com TM, ▲ concentração de AAPH, ▲ IND. **b)** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre o tônus do músculo liso traqueal. Os resultados estão expressos em média ± EPM. \*  $p < 0,01$  em relação ao efeito do AAPH sem e com a preservação do epitélio, ambos na presença da IND (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis).

**Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais com a preservação do epitélio, na presença e na ausência de indometacina**

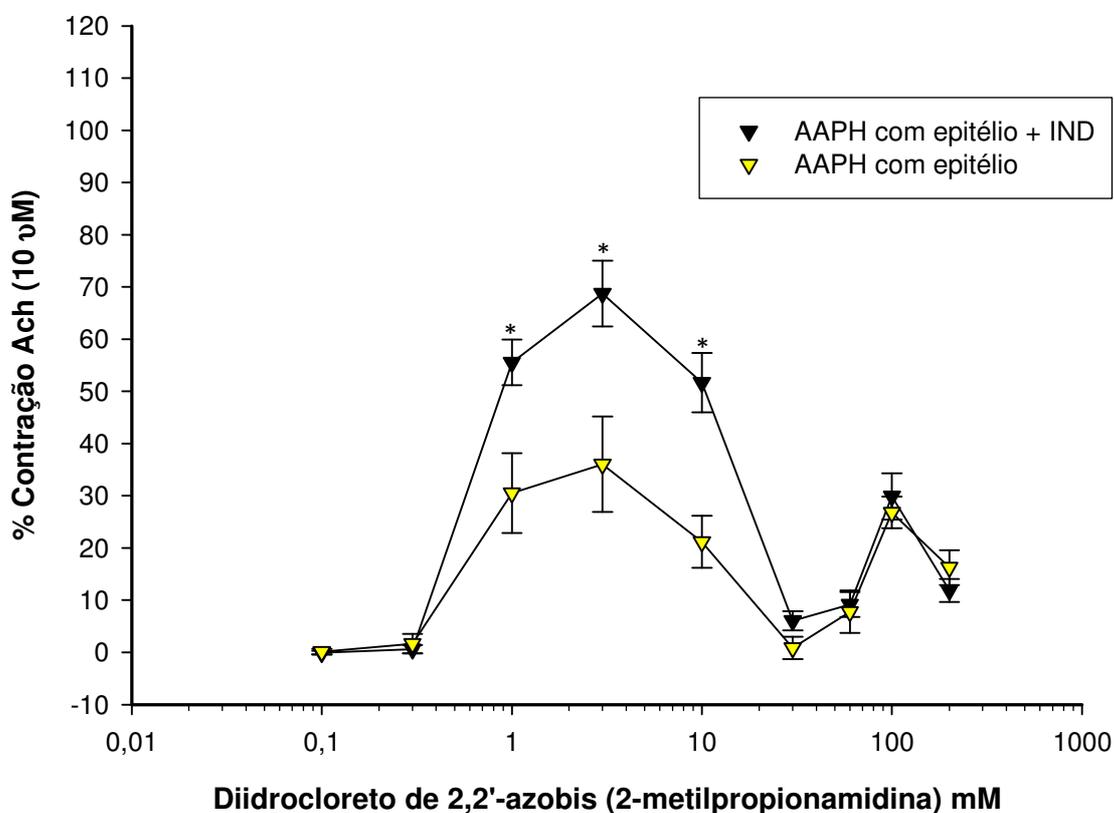
Quando comparamos o efeito do AAPH sobre o tônus basal das preparações traqueais com o epitélio preservado com aquelas em que o epitélio também foi preservado, porém na presença de IND, observamos que o efeito contraturante do AAPH foi potencializado (31a e 31b; tabela 6).

Nas concentrações 1, 3 e 10 mM o efeito contraturante do AAPH sobre o tônus foi estatisticamente significativo quando comparado com os experimentos em que a preparação foi incubada com IND ( $p < 0,01$ ). O efeito contraturante do AAPH foi máximo na concentração de 3 mM em ambas as preparações traqueais, porém, na presença de IND foi 32 % maior.

a)



b)

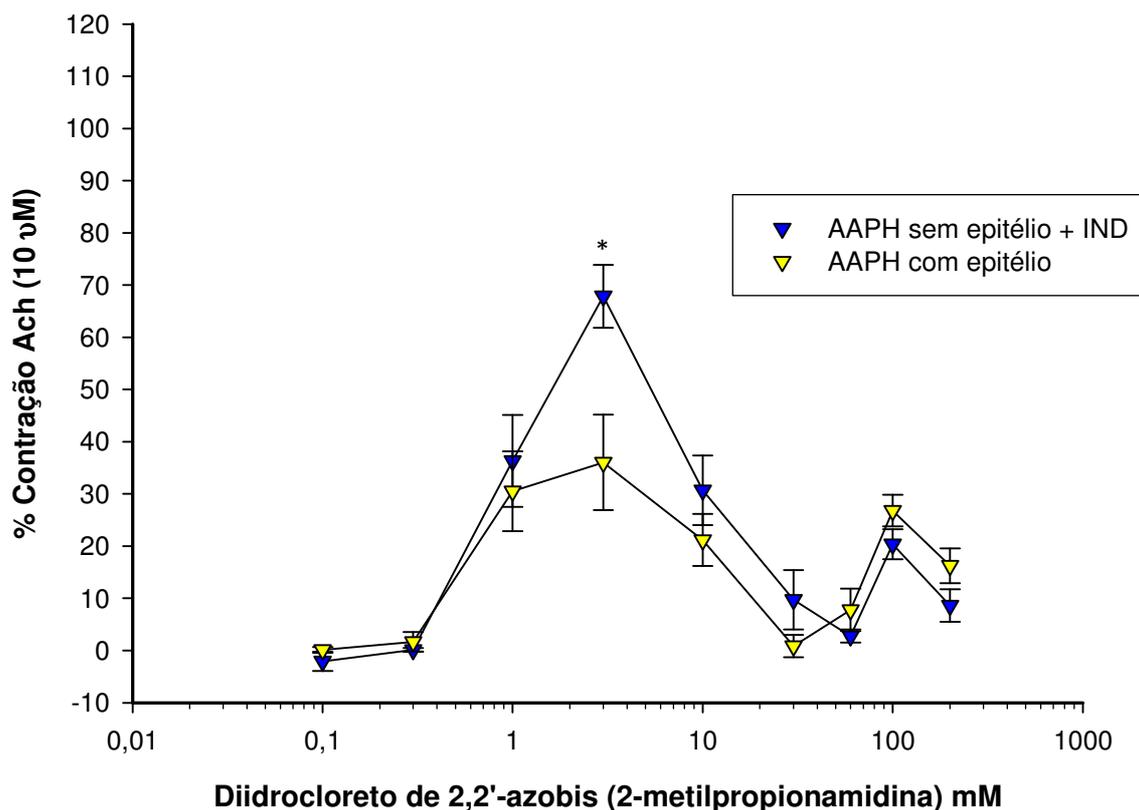


**Figura 31 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal com preserva o do epitélio, na presença (n=9) e ausência da indometacina (n=11). a)** Traçado ilustrativo do efeito do AAPH sobre o t nus do músculo liso traqueal, com a preserva o do epitélio e na presença da IND.  $\blacktriangledown$  Ach,  $\bullet$  lavagem TM,  $\blacktriangle$  concentra o de AAPH,  $\blacktriangle$  IND. **b)** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre o t nus do músculo liso traqueal. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,01$  em rela o ao efeito do AAPH com a preserva o do epitélio, na presença e na ausência da IND (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis).

### **Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais com a preservação do epitélio e sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina**

Comparamos o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal entre preparações sem a preservação do epitélio e na presença de IND, com preparações em que o epitélio foi preservado (figura 32; tabela 6). O AAPH apresentou também efeito contraturante, que foi estatisticamente significativo somente na concentração de 3 mM, quando comparado com os experimentos em que o epitélio foi preservado ( $p < 0,001$ ).

Nas preparações sem a preservação do epitélio e na presença da IND, o AAPH (3 mM) evocou contração que foi 31,84 % maior do que a contração evocada pela mesma concentração nas preparações em que o epitélio foi preservado.

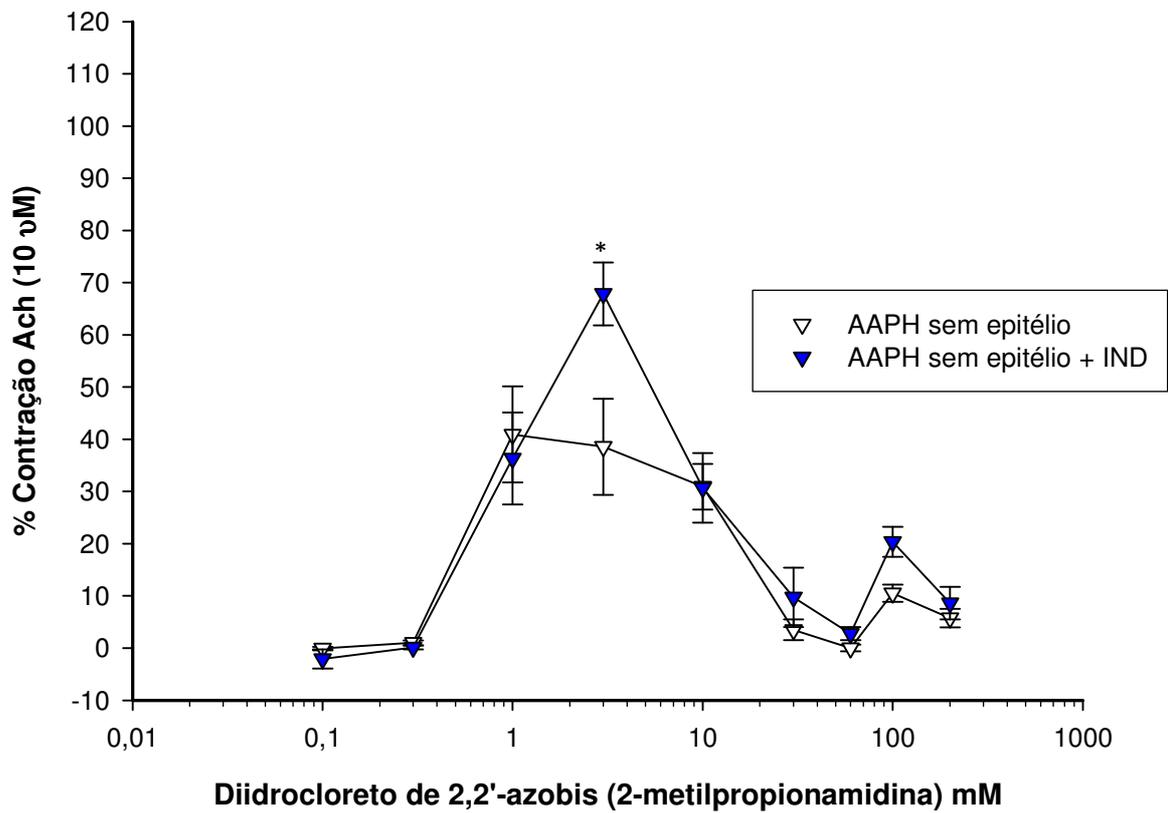


**Figura 32 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal com preservação do epitélio (n=9) e sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina (n=11).** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre o tônus do músculo liso traqueal. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  em relação ao efeito do AAPH com a preservação do epitélio e sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis).

### **Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações traqueais sem a preservação do epitélio, na presença e na ausência da indometacina**

Comparamos o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal entre preparações sem a preservação do epitélio, na presença e na ausência da IND (figura 33; tabela 6). O AAPH apresentou efeito contraturante, que foi estatisticamente significante somente na concentração de 3 mM, quando comparamos ambas as preparações ( $p < 0,001$ ).

Nas preparações sem a preservação do epitélio e na presença da IND, o AAPH (3 mM) evocou contração que foi 29,29 % maior do que a contração evocada pela mesma concentração nas preparações somente sem a preservação do epitélio.



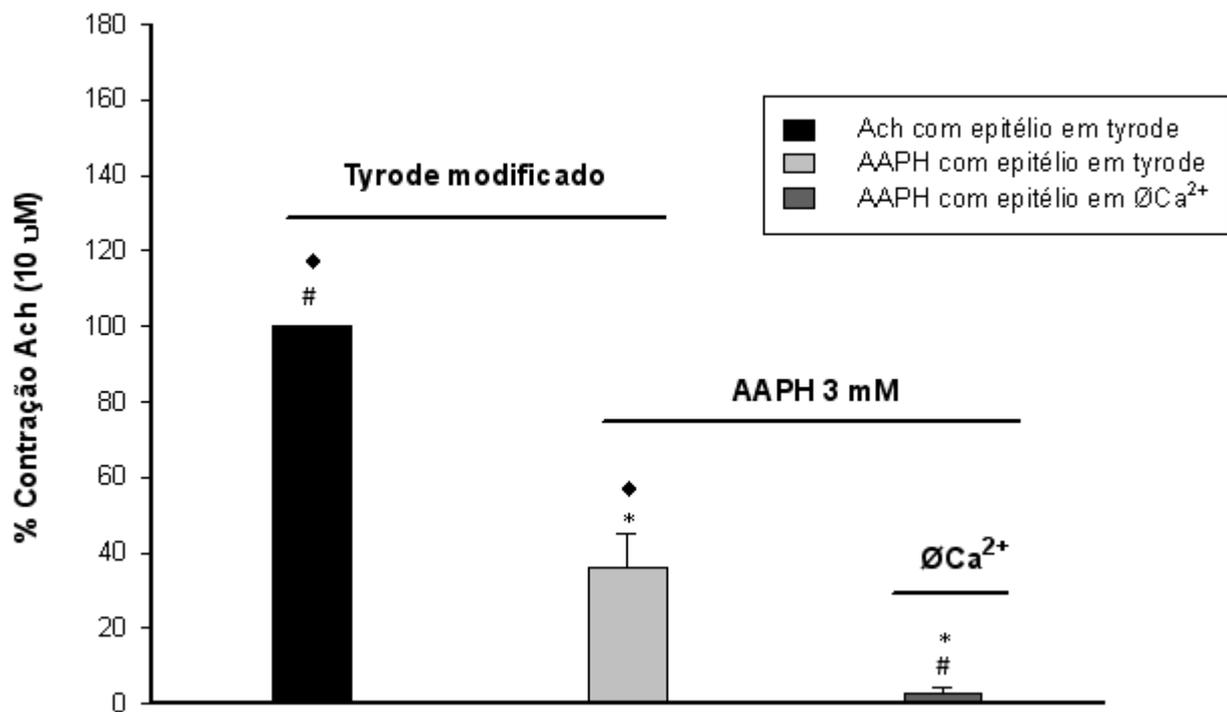
**Figura 33 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal sem preservação do epitélio, na presença (n=11) e na ausência (n=11) da IND.** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre o tônus do músculo liso traqueal. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,001$  em relação ao efeito do AAPH sem a preservação do epitélio, na presença e na ausência da indometacina (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis).

### **Efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações com a preservação do epitélio e mantidas em meio isento de $\text{Ca}^{2+}$**

Resolvemos investigar o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal em  $\text{Ca}^{2+}$ , ou seja, em meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para isso, submetemos a preparação, com a preservação do epitélio, em  $\text{Ca}^{2+}$  e adicionamos ao banho a concentração 3 mM de AAPH (figura 34). A partir desse protocolo experimental, adicionaremos ao banho a concentração de 3 mM, por ter sido a concentração que evocou contração máxima sobre o tônus do músculo liso traqueal.

O AAPH evocou contração mínima, ou seja, quase nula nas preparações traqueais em  $\text{Ca}^{2+}$ , e teve a amplitude média expressa em percentuais da contração submaximal de Ach igual a  $0,0290 \pm 0,012$  g. A amplitude de contração induzida por 3 mM de AAPH em TM e com a preservação do epitélio foi igual a  $0,3183 \pm 0,101$  g.

Quando comparamos as respostas contráteis induzidas pelo AAPH em  $\text{Ca}^{2+}$  e em TM, ambos com a preservação do epitélio, observamos diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 34** - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal em tyrode modificado (n=7) e em meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$  (n=5). Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre o tônus do músculo liso traqueal em  $\text{ØCa}^{2+}$ . Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  entre concentração 3 mM de AAPH em TM e em  $\text{ØCa}^{2+}$ .  $\blacklozenge$   $p < 0,01$  entre controle e concentração de AAPH em TM. #  $p < 0,01$  entre controle e concentração de AAPH em  $\text{ØCa}^{2+}$  (test t de student não pareado).

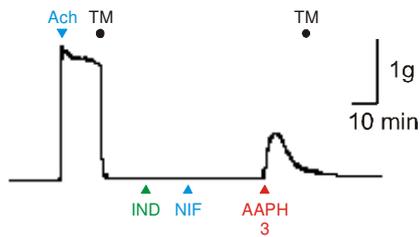
### **Efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina e nifedipina**

Resolvemos investigar o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal em preparações traqueais sem a preservação do epitélio e na presença da IND, para assegurar que estaremos estudando a resposta somente do músculo liso, independente da interferência do epitélio e dos produtos da via da COX.

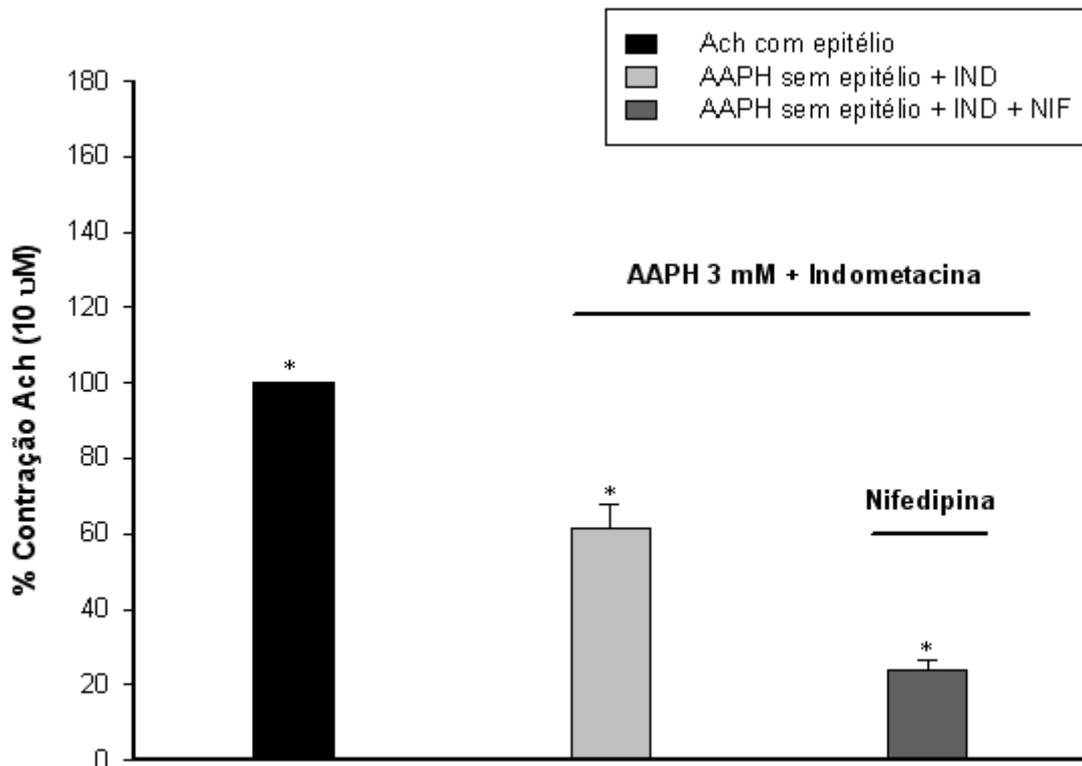
Para avaliarmos o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal por mecanismos que independam do influxo extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , adicionamos ao banho NIF, um bloqueador da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo canal do tipo L voltagem dependente (figura 35a e 35b; tabela 7).

O AAPH, na concentração de 3 mM, adicionado ao banho na presença de IND e NIF evocou contração ( $0,2692 \pm 0,028$  g) que foi menor do que a contração evocada por essa mesma concentração de AAPH na presença somente da IND ( $0,7616 \pm 0,098$  g). A contração evocada por AAPH em presença de IND foi estatisticamente significativa quando comparada com a contração evocada por AAPH em presença de IND e NIF ( $p < 0,05$ ).

a)



b)



**Figura 35 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina e nifedipina.**

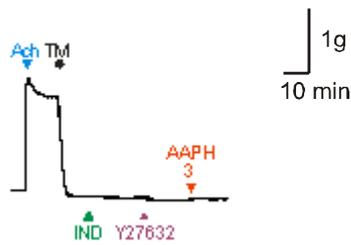
**a)** Traçado ilustrativo do efeito inibitório da nifedipina sobre a contração evocada por AAPH em preparações de músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio e na presença da indometacina. ▼ Ach, ● lavagem com TM, ▲ concentração de AAPH, ▲ IND, ▼ NIF. **b)** Gráfico representativo comparando o efeito do AAPH sobre o tônus do músculo liso traqueal em preparações na presença (n=8) e ausência da NIF (n=11). Os resultados estão expressos em média ± EPM. \*  $p < 0,05$  entre controle e preparações na presença e ausência da nifedipina (test t de student não pareado).

### **Efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina e Y27632**

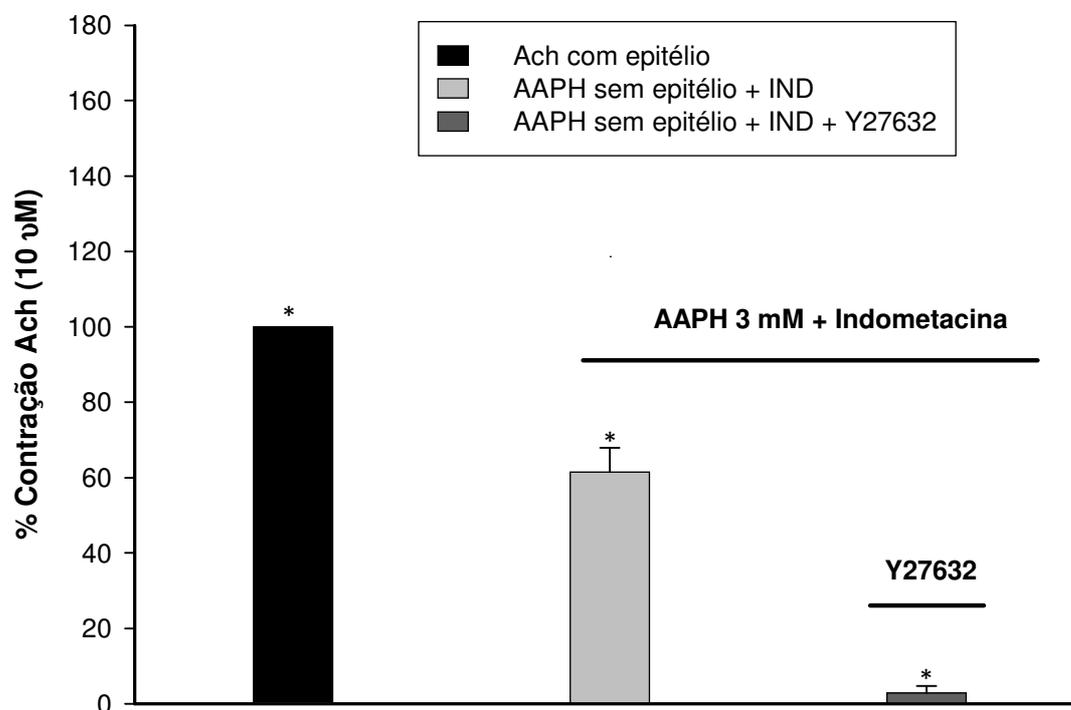
Para avaliarmos a participação da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  na presença AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal, adicionamos ao banho o Y27632, um bloqueador da via da ROCK. Para assegurar que estaremos estudando a resposta somente do músculo liso, independente da interferência do epitélio e dos produtos da via da COX, as preparações traqueais foram mantidas sem a preservação do epitélio e em presença de IND (figura 36a e 36b; tabela 7).

O AAPH, na concentração 3 mM, adicionado ao banho em presença de IND e Y27632, evocou contração ( $0,0236 \pm 0,013$  g), que foi inferior a contração evocada por essa mesma concentração de AAPH na presença somente da IND ( $0,7616 \pm 0,098$  g). Esse resultado demonstra o potente efeito inibidor do Y27632, que foi estatisticamente significante quando comparado com preparações traqueais somente na presença da IND ( $p < 0,05$ ).

a)



b)



**Figura 36 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina e Y27632.**

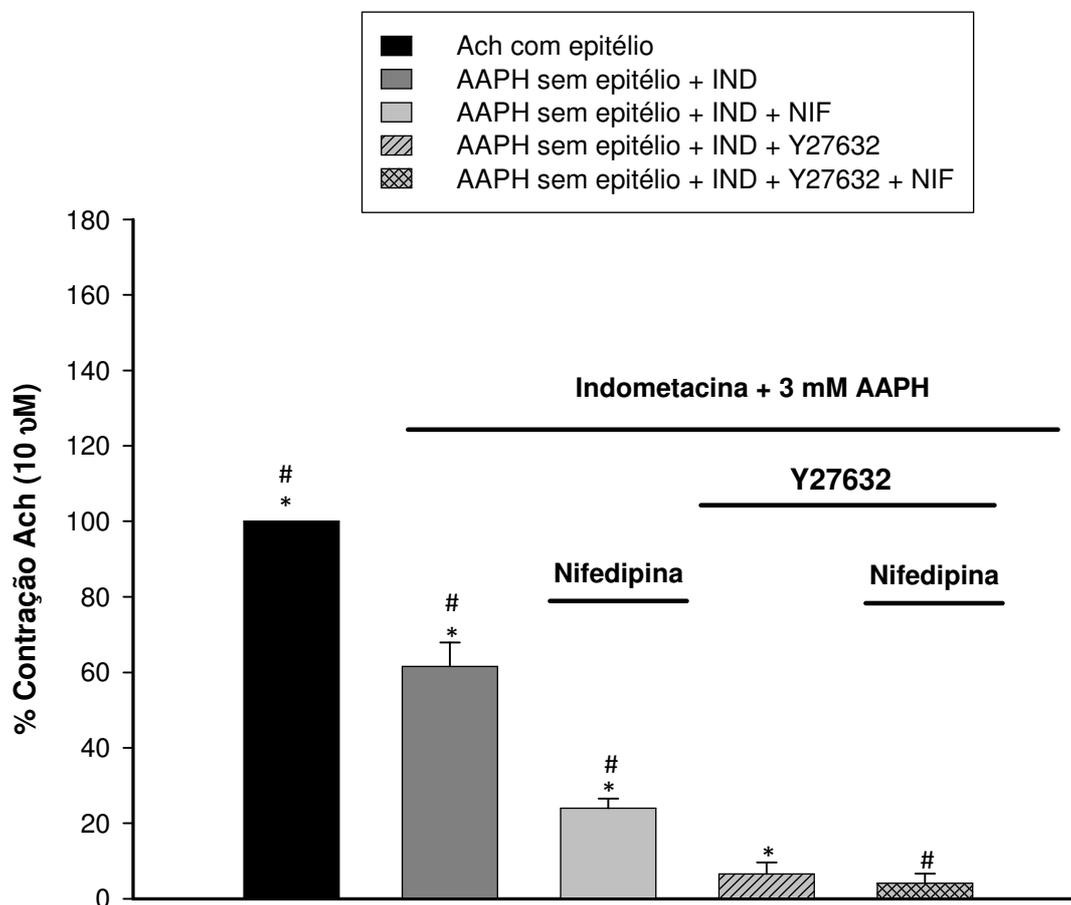
a) Traçado ilustrativo do efeito inibitório do Y27632 sobre a contração evocada por AAPH em preparações de músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio e na presença da indometacina. ▼ ACh, ● lavagem com TM, ▲ concentração de AAPH, ▲ IND, ▲ Y27632. b) Gráfico representativo comparando o efeito do AAPH sobre o tônus do músculo liso traqueal em preparações na presença (n=5) e ausência (n=11) da Y27632. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  entre controle e preparações na presença e na ausência de Y27632 (test t de student não pareado).

### **Comparação do efeito do AAPH sobre o tônus basal em preparações sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina, Y27632 e nifedipina**

Quando comparamos o efeito do AAPH (3 mM) sobre o tônus basal do músculo liso traqueal entre preparações traqueais em presença de IND e NIF ( $0,2692 \pm 0,028$  g), com preparações traqueais em presença de IND e Y27632 ( $0,0236 \pm 0,013$  g), observamos que ambas as substâncias diminuem de maneira significativa a amplitude de contração evocadas pelo AAPH, quando comparadas com preparações somente na presença da IND ( $0,7616 \pm 0,098$  g) (figura 37; tabela 7).

Entretanto, o Y27632 apresentou a particular característica de inibir quase totalmente a amplitude de contração evocada pelo AAPH, ao passo que a NIF diminuiu a contração provocada pelo AAPH, porém em menor magnitude. O efeito do AAPH em presença da NIF e Y27632 foi estatisticamente diferente quando comparados entre si ( $p < 0,05$ ).

Quando comparamos o efeito próprio do AAPH (3 mM) entre preparações traqueais em presença de IND e Y27632 ( $0,0236 \pm 0,013$  g), com as preparações traqueais em presença de IND, NIF e Y27632 ( $0,0200 \pm 0,006$  g), observamos que ambas preparações apresentam amplitudes de contrações semelhantes e não diferem estatisticamente entre si.



**Figura 37 - Comparação entre o efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina entre preparações na presença da nifedipina e do Y27632.** Gráfico representativo comparando o efeito do AAPH sobre o tônus do músculo liso traqueal entre preparações sem a preservação do epitélio e na presença da IND (n=11), na presença do Y27632 (n=5), na presença da NIF (n=8) e na presença da NIF e Y27632 (n=5). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  entre controle e preparações na presença da IND, na presença da IND e NIF, na presença da IND e Y27632. #  $p < 0,05$  entre controle e preparações na presença da IND, na presença da IND e NIF, na presença da IND, Y27632 e NIF (test t de student não pareado).

## DISCUSSÃO

---

Apesar de o AAPH, no que concerne a contratilidade, já ter sido estudado em músculo liso intestinal, como em íleo de cobaio e jejuno de coelho (PELUSO *et al.*, 2002), a literatura não documenta estudos dessa substância em músculo liso traqueal. Portanto, o presente estudo se constitui em uma contribuição à literatura que é original e, adicionalmente, relevante. Essa relevância advém do fato de o AAPH ser um agente modelo para indução da PL e indução da formação dos RL (PELUSO *et al.*, 2002), como também pelo fato de no acoplamento excitação-contração do músculo liso traqueal apresentar alterações peculiares ocasionadas em decorrências de doenças respiratórias que, por sua vez, estão relacionadas com o aumento na produção de RL (JANSEN, 2006).

Nosso objetivo foi simular o aumento na concentração de RL na presença do AAPH e investigar seus efeitos sobre a contratilidade de músculo liso traqueal de rato. O AAPH apresentou sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de ratos, a característica interessante de induzir contração bifásica em relação à concentração, como efeito próprio, e de ser um agente bloqueador de contrações induzidas por Ach e  $K^+$ . Outra característica interessante foi que o AAPH foi capaz de induzir potencialização da contração evocada por Ach, fato este que não foi observado sobre a contração evocada por  $K^+$ .

Sobre o tônus basal, o AAPH evocou contração bifásica que foi dependente de concentração. Esse achado está de acordo com a literatura quando foi avaliado o efeito do  $H_2O_2$  em músculo liso de aorta de cobaios (GAO e VANHOUTTE, 1993), músculo liso de traquéia de ratos (SZAREK e SCHMIDT, 1990) e gatos (BAUER *et al.*, 1997).

A camada epitelial que reveste a traquéia é capaz de sintetizar uma ampla variedade de substâncias biologicamente ativas, dentre elas os prostanóides (FOLKERTS e NIJKAMP, 1998). Os RL são conhecidos por estimular a liberação e o metabolismo do AA. A síntese dos prostanóides, a partir da metabolização do AA por RL, pode exercer diversos efeitos biológicos sobre a musculatura lisa, podendo variar de uma poderosa contração até um completo relaxamento, dependendo da espécie e

do tecido animal (JANSEN, 2000). A importância do epitélio na responsividade da via aérea é notória quando se avalia as repercussões provocadas pelo dano epitelial, uma consequência da inflamação das vias aéreas, que tem íntima participação com o aumento da produção dos RL. Estudos *in vitro*, têm demonstrado que a lesão epitelial ocasiona aumento da responsividade brônquica a diversos agentes farmacológicos (BOSKABADY e TEYMOORY, 2003).

Para elucidar a importância da participação do epitélio, realizamos experimentos em que o epitélio não foi preservado. Nossos resultados demonstraram que, de um modo geral, o epitélio não modulou o efeito contraturante do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal, pois somente apresentou diferença estatisticamente significativa na concentração de 100 mM quando comparado com preparações com a preservação do epitélio (figura 29). Portanto, nossos dados sugerem que o epitélio não modula de forma significativa o efeito do AAPH sobre o músculo liso traqueal de ratos.

Por outro lado, a contração induzido por AAPH foi de maneira importante modulada na presença de IND, pois houve diferença na amplitude de contração entre preparações com a preservação do epitélio, na presença e na ausência da IND, a uma dada concentração de AAPH (figura 31). A concentração de AAPH que evocou maior contração foi 3 mM, tanto na presença como na ausência da IND. Porém, quando comparamos essas amplitudes de contração na presença ( $0,906 \pm 0,12$  g) e na ausência ( $0,310 \pm 0,10$  g) de IND, podemos observar que a inibição dos metabólitos da via da COX apresenta importante e significativa modulação no efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal.

Portanto, em todas as preparações mantidas com ou sem a preservação do epitélio, porém na presença de IND, apresentaram maior amplitude de contração (figuras 30, 31, 32 e 33), demonstrando a importante participação dos produtos da via da COX no efeito do AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal.

Esses achados sugerem que o radical peroxil, a partir da decomposição do AAPH, poderia favorecer maior geração de prostanóides relaxantes ( $\text{PGI}_1$  e  $\text{PGE}_2$ ) do que prostanóides contraturantes ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  e  $\text{TXA}_2$ ) em músculo liso de traquéia de ratos com epitélio preservado. O mesmo resultado foi demonstrado em músculo liso

traqueal de coelhos em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e IND (PRASAD e GUPTA, 2002). Porém, em músculo liso traqueal de cobaias, a presença da IND inibiu a contração evocada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RHODEN e BARNES, 1989) e em ovelhas atenuou a broncoconstrição (LANSING, 1991). Esses resultados sugerem que, nessas espécies, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evoca maior liberação de prostanóides contraturantes a partir da via da COX. Essa observação e nossos resultados sugerem que há uma diferença substancial na produção dos metabólitos da via da COX entre as diferentes espécies e, por esse motivo seus efeitos fisiológicos pela ação dos RL são discrepantes.

Embora seja difícil prever a composição exata de prostanóides que são produzidos em presença de RL ou a resposta a esse complexa composição de autocóides, podemos afirmar que em presença de AAPH (radical peroxil), a maior parte da composição dessas moléculas evocam efeito inibidor como efeito geral, em músculo liso traqueal de ratos.

Como já foi anteriormente mencionado, os prostanóides são reconhecidos na literatura científica por modular a contratilidade do músculo liso, mas não há maiores evidências sobre os efeitos específicos dessas substâncias no músculo liso traqueal. As vias de sinalização são pouco conhecidas e quase não há publicações dos seus efeitos sobre cinases e canais iônicos. Talvez, mais importante ainda, os receptores que intermedeiam seus efeitos são pouco conhecidos. Uma melhor compreensão sobre as vias de sinalização pelas quais essas moléculas atuam pode permitir o desenvolvimento de novos fármacos para diversas doenças respiratórias, bem como doenças cardiovasculares. Nesse contexto, é interessante notar que algumas terapias para essas doenças (inibidores de COX, antagonistas de leucotrienos, anti-histamínicos, anti-colinérgicos, bloqueadores  $\alpha$ -adrenérgicos e  $\beta$ -agonistas) são ineficazes para anular os efeitos dos prostanóides.

Atualmente, um grande destaque na literatura científica tem sido dado à via da ROCK e sua interação com o aumento da sensibilização ao Ca<sup>2+</sup> no músculo liso em geral. Inibidores de ROCK são tão eficientes quanto os broncodilatadores (IIZUKA *et al.*, 1999). Entretanto, não há trabalhos publicados sobre a via da ROCK e sua relação com o efeito do AAPH sobre músculo liso traqueal. Portanto, para estudar a interação do AAPH com a via da sinalização da ROCK sobre o músculo liso traqueal, realizamos

experimentos usando inibidor de ROCK (Y27632), porém na presença da IND e sem a preservação do epitélio (para verificar somente a ação do AAPH sobre o músculo liso traqueal, sem a interferência do epitélio e dos metabólitos da via da COX).

Nossos dados revelaram que o Y27632 antagoniza de forma importante e significativa a contração evocada por 3 mM de AAPH em músculo liso de traquéia de ratos (figura 36). Nossos dados estão em concordância com recente estudo realizado em músculo liso traqueal de cobaias, onde o Y27632 antagonizou de maneira significativa a contração evocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KATSUYUKI *et al.*, 2006). Podemos então sugerir, que a ação contraturante do AAPH sobre o músculo liso traqueal de ratos atua provavelmente por uma via que depende do aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca<sup>2+</sup>.

Considerando que a via da ROCK está envolvida em processos patológicos de doenças respiratórias, nosso trabalho demonstra que o uso de inibidores dessa via é claramente uma promessa de terapia. Administração oral de inibidor de ROCK parece ser bem tolerada e sem graves efeitos colaterais em fase II de ensaios clínicos, indicando um perfil de segurança adequado (SHIMOIKAWA *et al.*, 2002). Além disso, estudos anteriores indicaram que quando aplicados por nebulização, inibidor de ROCK inibiu de maneira seletiva e sem aparentes efeitos sistêmicos, a pressão arterial pulmonar (NAGAOKA *et al.*, 2005) e a resistência das vias aéreas (IIZUCA *et al.*, 1999) em modelos de doenças animais. Embora esses estudos indiquem que inibidores de ROCK são razoavelmente seguros, estudos futuros são necessários para estabelecer a utilidade dos inibidores de ROCK no tratamento de doenças respiratórias (KATSUYUKI *et al.*, 2006).

Para avaliarmos a participação dos canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem dependentes do tipo L na contração evocada por 3 mM de AAPH, sem a preservação do epitélio e na presença de IND, realizamos experimentos usando a NIF, um bloqueador dos canais de Ca<sup>2+</sup> operados por voltagem do tipo L. Nossos dados relevaram que a NIF antagonizou parcialmente, mas de maneira significativa a contração evocada por essa dada concentração de AAPH (figura 35). Portanto, canais de Ca<sup>2+</sup> operados por voltagem do tipo L participam parcialmente da contração evocada por AAPH em músculo liso traqueal de ratos. Coerente com o presente estudo, achados sobre a contração

evocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em músculo liso traqueal de cobaios na presença de verapamil (bloqueador seletivo dos canais de Ca<sup>2+</sup> operados por voltagem), também inibiram parcialmente a contração evocada por essa substância (KATSUYUKI *et al.*, 2006). Além disso, pesquisas realizadas demonstraram que a contração evocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em músculo liso vascular de ratos foi devido ao aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, através da ativação dos canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem dependentes (SOTNIKOVA, 1998). Diante desses achados é razoável sugerir que a contração evocada por AAPH, com participação dos canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem dependentes, ocorre em parte por um aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

Adicionalmente à importância de avaliarmos a participação dos canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem dependentes do tipo L na contração evocada por 3 mM de AAPH, faz-se também importante e necessário avaliarmos a participação do influxo de Ca<sup>2+</sup> para contribuição desse efeito. Para isso, realizamos experimentos com a preservação do epitélio e em meio isento de Ca<sup>2+</sup>. Nossos dados revelaram que em meio isento de Ca<sup>2+</sup>, 3 mM de AAPH evocou contração mínima, demonstrando o papel essencial do Ca<sup>2+</sup> extracelular na contração evocada por AAPH (figura 34). Esse achado está coerente com a literatura, quando em músculo liso de traquéia de cobaios o AAPH falhou em evocar contração em meio isento de Ca<sup>2+</sup> (KATSUYUKI *et al.*, 2006).

Em estudo anterior, em células musculares lisas de traquéia de ratos, o aumento na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> evocadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi atribuído ao influxo de Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular e também à liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques internos (BAUER *et al.*, 1997). Em outro estudo em músculo liso de traquéia de caninos, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> primariamente através liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques internos (JANSEN *et al.*, 2000). Porém, no presente estudo o AAPH evocou contração mínima em meio isento de Ca<sup>2+</sup>. Assim, a liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques internos e o influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos canais operados por estoque, mostram-se hipóteses de probabilidade questionável para explicar a contração evocada por AAPH em músculo liso de traquéia de ratos.

Realizamos experimentos adicionais em que o músculo liso traqueal, sem a preservação do epitélio e em presença de IND, foi incubado com NIF e Y27632 simultaneamente. Nossos resultados mostraram que o bloqueador de ROCK juntamente com a NIF não exerceram inibição adicional relevante à contração de 3 mM de AAPH (figura 37). O efeito inibitório exercido pelo Y27632 e a NIF juntos foi

semelhante ao bloqueio exercido somente pela ação do Y27632 em músculo liso de traquéia de rato em presença do AAPH. Diante desse resultado, podemos sugerir que o aumento da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  evocado pelo AAPH se sobrepõe ao efeito sobre os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem. Porém, podemos afirmar que a contração evocada pelo AAPH sobre o tônus basal do músculo liso traqueal está relacionada não só ao aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  através da ativação da via da ROCK, como também a manutenção do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como o bloqueio da contração pela remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular é bem maior do que aquele promovido pela NIF, sugere-se que outras vias de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular estejam envolvidas. Entretanto, o mecanismo que envolve a regulação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e a ativação da via da ROCK ainda são incertos.

Os RL evocam uma variedade de respostas mecânicas no músculo liso traqueal, dependendo das condições experimentais, como o estado do tônus do músculo liso (interação com agonistas) e as espécies animais examinadas. Sobre o acoplamento farmacomecânico o AAPH apresentou duplo efeito em anéis de traquéia com e sem a preservação do epitélio: 1) em baixas concentrações foi capaz de potencializar as contrações induzidas por Ach, 2) em concentrações maiores foi capaz de reverter totalmente as contrações induzidas por Ach (figura 23). Sobre o acoplamento eletromecânico o AAPH também apresentou efeito inibidor em anéis de traquéia com e sem a preservação do epitélio, porém não apresentou efeito potencializador (figura 26).

O efeito potencializador sobre a contração colinérgica, em baixas concentrações do AAPH, é um dado novo na literatura, não tendo sido observado no único trabalho realizado com esse reagente em músculo liso intestinal (PELUSO *et al.*, 2002). É bem aceito na literatura científica que a ativação da via da ROCK por agonistas como a Ach, pode promover o aumento da fosforilação da MLCK, resultando em manutenção ou aumento da contração no músculo liso (FERNADES *et al.*, 2006). É documentado na literatura científica que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi capaz de evocar contração em músculo liso traqueal de cobaias por ativação da via da ROCK (KATSUYUKI *et al.*, 2006), o que corrobora com o presente trabalho, uma vez que também observamos uma contribuição da via da ROCK para o efeito contraturante evocado por AAPH (figura 36).

Podemos ainda citar que o AAPH foi capaz de evocar contração sobre o tônus basal do músculo liso traqueal e também evocar potencialização da contração da Ach, ambas em uma faixa similar de concentração (figuras 23 e 36). Portanto, é razoável lançar a hipótese de que o efeito potencializador da contração colinérgica evocado por AAPH tenha uma participação por um aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nas preparações em que o epitélio não foi preservado, o efeito potencializador na contração colinérgica evocado pelo AAPH não foi relevante quando comparado com o controle (figura 24). Esse efeito pode ser explicado através de várias hipóteses. Como a desepitelização já aumenta a amplitude de contração, levando-as para valores próximos do limite fisiológico de contração máxima do músculo, uma hipótese que se mostra atrativa é que a grande redução da potencialização se deva a saturação contrátil nas preparações sem a preservação do epitélio. Quando comparamos as  $\text{EC}_{50}$  do efeito potencializador do AAPH nas preparações em que o epitélio foi preservado ( $\text{EC}_{50} = 0,8776 \pm 0,415 \text{ mM}$ ) com aquelas em que o epitélio não foi preservado ( $\text{EC}_{50} = 0,3388 \pm 0,343 \text{ mM}$ ), percebemos que não houve diferença estatisticamente significativa em ambas.

Em relação ao efeito inibitório do AAPH sobre a contração pela Ach, nossos dados são similares aos da literatura, uma vez que estudos sobre o efeito do  $\text{H}_2\text{O}_2$  também demonstraram efeito inibidor sobre a contração colinérgica em músculo liso traqueal de coelhos (GUPTA e PRASAD, 1992) e em caninos (JANSEN *et al.*, 2000; LORENZ *et al.*, 1999).

O presente estudo não objetivou elucidar o mecanismo de ação da atividade inibidora do AAPH. Contudo, algumas conclusões relacionadas a esse mecanismo podem ser apresentadas. O bloqueio à contração induzida por 60 mM de  $\text{K}^+$  torna pouco provável a ocorrência de muitos mecanismos de ação, tais como: i) atuação em canais de  $\text{K}^+$  da membrana citoplasmática do músculo liso; ii) alteração do potencial transmembrana (KNOT *et al.*, 1996).

É pouco provável que a atividade anti-espasmódica seja resultante da hiperpolarização da membrana citoplasmática (HERMSMEYER *et al.*, 1998) que é

consequente a alterações da condutância da membrana citoplasmática do músculo liso a íons, inclusive ao  $K^+$  (ativação de canais de potássio). Essa pequena probabilidade de hiperpolarização resulta da grande ativação dos canais de  $K^+$  da retificação retardada a uma  $[K^+]_o$  de 60 mM.

Nessa situação essa retificação realiza algo similar a um clameamento de voltagem transmembrana no potencial do equilíbrio  $K^+$  ditado pela  $[K^+]_o$  de 60 mM, ou seja, aproximadamente  $-20$  mV. Medidas do laboratório de Eletrofisiologia do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da UECE, disponíveis na literatura, têm documentação de que à concentração extra-celular de  $K^+$  de 60 mM, o potencial de repouso em vários tipos de músculo liso (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 2004), inclusive o traqueal, se situa em torno de  $-20$  mV.

Assim, os dados desse estudo sugerem que o efeito inibidor do AAPH se origina de uma ou várias atuações em etapas da cascata de reações do acoplamento excitação-contração e/ou da contração propriamente dita que são posteriores às etapas comuns ao acoplamento fármaco e eletromecânico (REMBOLD, 1996).

Esses dados nos sugerem que o efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico e farmacomecânico ocorre via receptores de membrana citoplasmática para neurotransmissores e autocóides. Esse dado é reforçado por estudos anteriormente realizados, onde se afirma que o epitélio modula a contratilidade do músculo liso traqueal através da liberação de neurotransmissores e autocóides (GOLDIE *et al.*, 1990; HAY *et al.*, 1993; DEVALIA *et al.*, 1997).

Assim a comparação dos dados do presente trabalho com os disponíveis na literatura científica para o  $H_2O_2$ , sugerem que os efeitos aqui observados não são específicos para a substância AAPH, mas sim originários dos RL por ela produzidos.

## CONCLUSÃO

---

- O AAPH, em concentrações menores, é capaz de evocar potencialização da contração de Ach em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio.
- O AAPH, em concentrações maiores, é capaz de evocar inibição da contração de Ach em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio.
- Ambos os efeitos do AAPH, potencializador e inibidor, sobre o acoplamento farmacomecânico são modulados pelo epitélio
- O AAPH é capaz de inibir a contração evocada por potássio em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio.
- O efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico é modulado pelo epitélio.
- O AAPH apresenta efeito contraturante sobre o tônus basal do músculo liso traqueal em preparações com e sem a preservação do epitélio.
- O efeito contraturante do AAPH sobre o tônus não foi modulado pelo epitélio.
- O efeito contraturante do AAPH sobre o tônus pode ser mediado por vias que dependem dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes do tipo L; do influxo externo de  $\text{Ca}^{2+}$  e da sensibilização das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , através da via da ROCK.
- Os produtos da via da COX, provavelmente atua de forma protetora sobre o tônus basal do músculo liso traqueal.
- Os efeitos do AAPH sobre o músculo liso traqueal são originários dos radicais livres (radical peroxil) produzidos por essa substância.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDALLA, D. S. P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. *Ars Cvrandi*. 26: 41-164, 1993.

ALDRED, S.; GRIFFITHS, H. R. Oxidation of protein in human low-density lipoprotein exposed to peroxy radicals facilitates uptake by monocytes; protection by antioxidants in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 15:111-117, 2004.

ALLEN, B. G.; WALSH, M. P. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. *TIBS*. 19: 362-368, 1994.

ANDRADE, JR. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *J. Bras. Pneumol*. 31: 60-68, 2005.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 30: 141-155, 1997.

BARNES, P.J. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radicals*. 121: 867-874, 1990.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova*. 29 (1): 113-123, 2006.

BARRY, O.P. IPF2 $\alpha$ -I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 95: 3449-3454, 1995.

BARTOSZ, G.; SOSZYSKI, M. Decrease in Accessible Thiols as an Index of Oxidative Damage to Membrane Proteins. *Free Radical Biology and Medicine*. 23: 463-469, 1997.

BASU, T. K; TEMPLE, N. J; CARG, M. L. Antioxidants in Human Health and Disease London. British Library. 23: 463-469, 1999.

BAUER, V.; TANAKA, H.; INOUE, R.; ITO, Y., Hydrogen peroxide induced responses of cat tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol*. 29: 63-69, 1997.

BECKER, B. F.; MOBERT, J. Cyclooxygenase inhibition aggravates ischemia-reperfusion injury in the perfused guinea pig heart: involvement of isoprostanes. *J Am Coll Cardiol*. 56: 1687-1694, 1998.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*. 65: 1865-1874, 1999.

BEST, C.; TAYLOR, N. Physiological basis of medical practice. 12 ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 24 - 46, 1990.

BILLINGTON, C. K.; PENN R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research*, 4:2 2003.

BOS, J. L.; REHMANN, H.; WITTINGHOFER, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 129(5), 865-877. Review, 2007.

BOSKABADY, M.; TEYMOORY S. The influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig trachea to -adrenergic agonist and antagonist. *Med Sci Monit*. 9(9): 336-342, 2003.

BOUSHEY H, A.; HOLTZMAN, M J.; SHELLER, J. R.; NADEL, J. A. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 121(2):389-413, 1980.

BOWLER, R. P.; CRAPO, J. D. Oxidative Stress in Airways: is there a Role for Extracellular Superoxide Dismutase? *Am. J. Respir Crit. Care Med*. 166: 38-43, 2002.

BRUCE, C.; KORCARZ, C. E.; HIRSCH, A. T., DECARA, J. M., MOHLER, E. R., POGUE, B., POSTLEY, J., TZOU, W. S., STEIN, J. H.. Carotid Intima-Media Thickness Testing by Non-Sonographer .*Journal of the American Society of Echocardiography*. 21: 234-242, 2008.

CABRINI, L.; LANDI, L.; CIPOLLONE, M.; FIORENTINI, D.; FARRUGGIA, G.; GALLI, M. C. Injury of rat thymocytes caused by exogenous peroxy radical in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1239: 207–12, 1995.

CARL, A., LEE, H. K., SANDERS, K. Regulation of ion channels in smooth muscle by calcium. *Am. J. Physiol*. 271: C9 – C34, 1996.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 37: 949-962, 1999.

CHUNG-MAN, H. O. J.; ZHENG, S.; COMHAIR, S. A.; FARVER, C.; ERZURUM, S. C. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Câncer Res*. 61 (23): 8578-8885, 2001.

CIABATTONI G.; MONTUSCHI P.; PAREDI P.; CORRADI M.; HODSON M. I.; KHARITONOV S A.; BARNES P. J. 8-Isoprostane of oxidative stress, is increased in cystic fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med*. 159: A271, 1999.

CIABATTONI, G.; MONTUSCHI, P.; MACAGNO, F.; PARENTE, P.; VALENTE, S.; LAURIOLA, L.; CIAPPI, G.; KHARITONOV, S. A.; BARNES, P. J. Effects of cyclo-oxygenase inhibition on exhaled eicosanoids in patients with COPD. *Thorax*. 60(10):827-33, 2005.

COELHO-DE-SOUZA, A.N. Estudo dos efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis de

músculo liso. Fortaleza, 1997. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

COLEMAN, M. L.; OLSON, M. F. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 9(5): 493-504, 2002.

CRIDDLE, D. N.; SOARES-DE-MOURA, R.; GREEMWOOD, I. A.; LARGE, W. A. Inhibitory actions of niflumic acid on noradrenaline-induced contraction of the rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 118: 1065 – 1071, 1996.

CROSS, C. E.; VALACCHI, G.; SHOCK, B.; WILSON, M.; WEBER, S.; EISERICH, J., VLIET A. Environmental Oxidant Pollutant Effects on Biologic System. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166: 44-50, 2002.

DARLINGTON, L. G; STONE, T. W. Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr.* 85(3):251-69, 2001.

DAVIES, K. J. A. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. In: *Biochem Soc Sympo.* 61: 1-31, 1994.

DEL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand.* 492: 153-168, 1980.

DELANTY, N.; DICHTER, M. A. Oxidative injury in the nervous system. *ActaNeurol. Scand.* 98: 145-153, 1998.

DEVALIA, J.L.; BAYRAM, H.; RUSZNAK, C.; CALDERON, M.; SAPSFORD, R.J.; ABDELARIZ, M.A. WANG; J.; DAVIES, R.J. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways. *Allergy.* 52: 45 – 51, 1997.

ESTERBAUER, H.; JURGENS, G.; QUEHENBERGER, O.; KOLLER, E. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res.* 28(5): 495-509,1987.

FENG, J.; ITO; M., NISHIKAWA, M.; OKINAKA, T.; ISAKA, N.; HARTSHORNE, D.J.; NAKANO, T. Dephosphorylation of distinct sites on the 20kDa myosin light chain by smooth muscle myosin phosphatase. *FEBS.* 448: 101 – 104, 1990.

FERNANDES, L., D'APRILE, A SELF, G., MCGUIRE, M., SEW, T., HENRY, P., GOLDIE, R. A Rho-kinase inhibitor, Y-27632, reduces cholinergic contraction but not neurotransmitter release. *European Journal of Pharmacology (550)* 155–161, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43: 61-68, 1997.

FIORI, R.; FRISTCHER, C. C. Variação na prevalência de asma em um grupo de escolares de Porto Alegre/RS. *J Pneumol.* 27: 237-242, 2001.

FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F. P. Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends in Pharmacological Sciences.* 19 (8): 334-341, 1998.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, I. O. Iron Toxicity and antioxidant nutrientes. *Toxicology.* 180: 23-32, 2002.

FUJISAWA T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 4(4):505-509, 2005.

FUKATA, Y.; KAIBUCHI K.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends in Pharmacological Sciences.* 22 (1): 32-39, 2001.

GAO, Y.; VANHOUTTE, P.M. Products of cyclooxygenase mediate the responses of the guinea pig trachea to hydrogen peroxide. *J. Appl. Physiol.* 74: 2105–2111, 1993.

GERGEN, P. J.; MULLALLY, D. I. National survey of prevalence of asthma among children in the United States, 1976 to 1980. *Pediatrics,* 88:1-7, 1988.

GIASSON B. I.; ISCHIROPOULOS H.; LEE M. I.; TROJANOWSKI, J. Q. *Free Radical Biology and Medicine.* 32 (12): 1264-1275, 2002.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev.,* v.54, n. 2, p. 271-284. 2002.

GOLDIE, R.G.; FERNANDES, L.B.; FARMER, S.G.; HAY, D.W. Airway epithelium-derived inhibitory factor. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:67 – 70, 1990.

GRAHAM N. M. H. The epidemiology of acute respiratory infections in children and adults: a global perspective. *Epidemiol Rev.* 12:149-178, 1990.

GÜNÇİN, I.; BEYDEMİR, S.; ALICI, H. A.; ELMASTAS, M.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. In Vitro Antioxidant Properties of Morphine. *Pharmacological Researchn.* 49:59-66, 2004.

GUREL A.; ILHAN A.; ARMUTCU F.; KAMISLI S.; IRAZ M. Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Neuropharmacology.* 49 (4): 456-464, 2005.

GUTIÉRREZ, J. R. V. Dano oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Cubana Med. Milit.* 31: 126-133, 2002.

HAI, C.M.; MURPHY, R.A. Ca<sup>++</sup> crossbridge phosphorylation and contraction. *Ann Rev Physiol* 51: 285-298, 1989.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. 45: 1-7, 2001.

HAY, D. W.; HENRY, P. J.; GOLDIE, R.G. Endothelin and the respiratory system. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 29 – 32, 1993.

HEMPHILL, D.; THOMSON, A.; JEEJEEBHOY, K. N. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. *Dig. Dis.* 16: 152–8, 1998.

HENRICKS, P. A. J.; NIJKAMP, F. P. Reactive Oxygen Species as Mediators in Asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 14 (6): 409-420, 2001.

HENRIQUES, J. A. P.; BROZMANOVA, J.; DUDÁS, A. Repair of oxidative DNA damage-an important factor reducing cancer risk. *Neoplasma.* 48: 85-93, 2001.

HERMSMEYER, K.; STUREK, M.; RUSCH, N. J. Calcium channel modulation by dihydropyridines in vascular smooth muscle. *Ann. NY Acad Sci.* 522: 25 – 31, 1998.

HOLGATE, S. T.; LORDAN, J.; DJUKANOVIC, R. Pathophysiology and clinical aspects of respiratory allergies with reference to asthma. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 40 (1): 168-176, 2000.

HORTON, J. W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology.* 189: 73-88, 2003.

HSIEH, R. J.; KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products and inhibition with emphasis on fish. *Advanced in Food and Nutrition Research.* 33: 233-340, 1989.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry.* 26: 2489-2491, 1987.

IIZUKA, K.; SHIMIZU, Y.; TSUKAGOSHI, H.; YOSHII, A.; HARADA, T.; DOBASHI, K.; MUROZONO, T.; NAKAZAWA, T.; MORI, M. Evaluation of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 406: 273–279, 2000.

ITO, M.; KIMURA, K.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated protein kinase (Rho-kinase). *Science.* 273: 245–248, 1996.

JANSSEN L. J. Isoprostanes: Generation, Pharmacology, and Roles in Free-radical-

mediated Effects in the Lung. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 13(4) 149-155, 2000.

JANSSEN, L. J.; KILLIAN, K. Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: history and new directions. *Respir Res*. 29:123-127, 2006

JANSSEN, L. J. Ionic mechanisms and  $Ca^{2+}$  regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol*. 282 (6): L1161 -1178, 2002.

JANSSEN, L. J.; NETHERTON, S. J.; WALTERS, D. K.  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels and  $Na^+/K^+$ -ATPase mediate  $H_2O_2$ - and superoxide-induced relaxations in canine trachealis. *J Appl Physiol*. 88: 745–752, 2000.

JIN, N.; WAGNER, R. S.; WEARE, C.; MOHLER, E. R.; RHOADES, R. A. Characterization of signal transduction events stimulated by 8-epi-prostaglandin (PG)F<sub>2</sub> alpha in rat aortic rings. *Prostaglandins*. 54: 581–599, 2007.

JOHN GW, VALENTIN JP. Analysis of the pulmonary hypertensive effects of the isoprostane derivative, 8-iso-PGF<sub>2</sub>alpha, in the rat. *Br J Pharmacol*. 122(5):899-905, 1997.

JORDÃO, JR.; A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCH, H. Lipid Peroxidation and ethanol: Role of Vitamin-E e Glutathione. *Medicina, Ribeirão Preto*. 31: 434-449, 1998.

JOVANOVIC, S. V.; CLEMENTS, D.; MACLEOD K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*. 25 (9): 125-134, 1998.

KAMAYA, Y.; NIKKI, E.; KAWAKAMI, A.; YAMAMOTO, Y. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull Chem Soc Japan*. 59:497-501, 1986.

KANG, K. H.; MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J. Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol*. 74(1):460-5, 1993.

KANNO, S.; SHOUJI. A.; ASOU, K.; ISHIKAWA, M. Effects of Naringin on Hydrogen Peroxide – Induced Cytotoxicity and Apoptosis in P388 Cells. *Journal. Pharmacological Sciences*. 92: 166-170, 2003.

KATSUMATA, U. Oxygen radicals produce airway constriction and hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis*. 141: 158-165, 1990.

KATSUYUKI, K.; KUME, H.; ITO, S.; OGUMA, T.; SHIRAKI, A.; KONDP, M.; ITO, Y.;

SHIMOKATA, K. Direct effects of hydrogen peroxide on airway muscle tone: Roles of Ca<sup>2+</sup> influx and Rho-kinase. *European Journal of Pharmacology*. 556: 151-146, 2006.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho kinase) *Science*. 273: 245-248, 1996.

KITAZAWA, T.; ETO, M.; WOODSOME, T.P.; BRAUNTINGAM, D.L. Agonists trigger G-protein mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*. 275: 9897-9900, 2000.

KNOT, H.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M.T. Calcium channels and potassium channels. In BARANY, M. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. Academic Press. 16: 203 - 219, 1996.

KROMER B. M., TIPPINS J. R. Actions of 8-epi prostaglandin F<sub>2</sub> on isolated rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* . 32:471-478, 1998.

KUMAR, R. K.; ABBAS, A. K., FAUSTO, N. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 91: 93-104, 2001.

LANSING, M. Lipid mediators contribute to oxygen-radical-induced airway responses in sheep. *Am. Rev. Respir. Dis*. 144: 1291-1296, 1991.

LAZARUS, S. C.; BOUSHEY, H. A.; FAHY, J. V.; CHINCHILLI, V. M.; LEMANSKE, R. F.; SORKNESS, C. A. Long-action beta<sub>2</sub>-agonist monotherapy continued therapy with inhaled corticosteroids in patients with persistent asthma: a randomized controlled trial. *JAMA*. 285: 2583-2593, 2001.

LENFANT, F.; LAHET, J. J.; VERGELY, C.; VOLOT, F.; FREYSZ, M.; ROCHETTE, L. Lidocaine inhibits potassium efflux and hemolysis in erythrocytes during oxidative stress in vitro. *General Pharmacology*. 34(3): 678-695, 2000.

LIU, L.; YANG, G.; X. U. J.; LI, T. Effect of arginine vasopressin on vascular reactivity and calcium sensitivity after hemorrhagic shock in rats and its relationship to Rho-kinase. *J Trauma*. 61(6):1336-1342, 2006.

LLOYD, R. V.; HANNA, P. M.; MASON, R. P. The Origin of the Hydroxyl Radical/Oxygen in the Fenton Reaction. *Free Radical in Biology & Medicine*. 22: 885-888, 1997.

LOO, G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 14(2): 564-574, 2003.

MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a miogenic activity. *Fundamental and Clinic pharmacology*. 18: 539-546, 2004.

MAIER, C.; CHAN, P. H. Role Superoxide Dismutases in Oxidative Damage and Neurodegenerative Disorders. *The Neuroscintist*. 8: 323-334, 2002.

MARKS, F., DECKER K. M., FÜRSTENBERGER G. A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Toxicology*. 153 (1): 11-26, 1996.

MASUO, M.; REARDON, S.; IKEBE, M.; KITAZAWA, T. A novel mechanism for the  $Ca^{2+}$ -sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Gen Physiol*. 104(2):265-86, 1994.

MATHRU, M.; ROONEY, M. W.; DRIES, D. J.; HIRSCH, L. J.; BARNES, L.; TOBIN, M. J. Hydrogen peroxide during adult respiratory distress syndrome in patients with and without sepsis. *Chest*, January. 105 (1) 6-232, 1994.

MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. 49: 345-361, 1995.

McFADZEAN, I.; GILSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol*. 135: 1-13, 2002.

MENEGHINI, R. A Toxidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*. 5: 57-62, 1987.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52: 673-751, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, Estatísticas de Mortalidade, 2000.

NAGAOKA, T.; FAGAN, K. A.; GEBB, S.A.; MORRIS, K. G.; SUZUKI, T.; SHIMOKAWA, H.; MCMURTRY, I. F.; OKA, M. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 171: 494-499, 2005.

PELUSO, I.; CAMPOLONGO, P.; VALERI, P.; ROMANELLI, L.; PALMERY, M. Intestinal motility disorder induced by free radicals: A new model mimicking oxidative stress in gut. *Pharmacological Reserach* 46(6): 533-538, 2002.

PICADA J. N.; MOREIRA J. C. F.; DAL-PIZZOL F.; BONATTO F.; SILVA E. G., FLORES D. G.;

ROESLER R.; HENRIQUES J. A. P. Oxidative damage in brains of mice treated with apomorphine and its oxidized derivative. *Brain*. 992(2): 234-243, 2003.

PIERRE, J. L.; FONTECAVE, M. Iron and Activated Oxygen Species in Biology: The Basic Chemistry. *Biometals*. 12:195-199, 1999.

PÔRTO, W. G. Radicais livres e neurodegeneração. Entendimento Fisiológico: Base para uma nova terapia. *Revista Neurociências*. 9(2): 70-76, 2001.

PRASAD, K.; GUPTA, J. B. Relaxant effect of oxygen free radicals on rabbit tracheal smooth muscle. *Pulm. Pharmacol. Ther* 15, 375–384, 2002

RAHMAN I.; MACNEE W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radical Biology and Medicine*. 28 (9): 436-445, 2000.

RECKMAGE R. O.; GLENDE E. A.; RAHMANI I.; MORRISON D.; DONALDSON K.; MACNEE W.; DOLAK J. A. WALLER R. L. Mechanism of Carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology and Therapeutics*. 43: 139-154, 1989.

REMBOLD, C. Eletromechanical and Pharmacological coupling. In: BARANY, M. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. New York. 227-239, 1996.

RHODEN, K J.; BARNES, P J. Effect of hydrogen peroxide on guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro: role of cyclooxygenase and airway epithelium. *Brit J Pharmacol*. 98: 325-330, 1989.

RIENTO, K.; RIDLEY A. J. Inhibition of ROCK by RhoE. *Methods in Enzymology*. 406: Pages 533-541, 2003.

RUNCHARD, N. A; KELLY, F. J. Introduction: In PUNCHARD, N. A; KELLY, F. J. *Free Radical: a practical approach*. Oxford: University Press,1-8, 1996.

SALVEMINI. D.; CUZZOCREA, S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med*. 33(9):1173-85, 2002.

SARKAR, A.; BHADURI, A. Black Tea is a Powerful Chemopreventor of ReactiveOxygen and Nitrogen Species: Comparison with its Individual Catechin Constituentsand Green Tea. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 284: 173-178, 2001.

SATO Y.; KAMO S.; TAKAHASHI T.; SUZUKI Y. Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by water-soluble radical initiator. *Biochemistry*. 28: 8940-8949, 1995.

SHIMOKAWA, H.; HIRAMORI, K.; IINUMA, H.; HOSODA, S.; KISHIDA, H.; OSADA, H.; KATAGIRI, T.; YAMAUCHI, K.; YUI, Y., MINAMINO, T.; NAKASHIMA, M.; KATO, K. Anti-

anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 40: 751–761, 2002.

SOMLYO A. V., SOMLYO A. P. Calcium content of peripheral and central mitochondria in the guinea pig myocardium: electron probe analysis. *Cell Calcium.* 33(4): 247-256, 2003.

SOMLYO, A.V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy.* 159: 129-145, 1968.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies.* 327: 649-662, 2004.

SOTNIKOVA, R. Investigation of the mechanisms underlying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked contraction in the isolated rat aorta. *Gen. Pharmacol.* 31, 115–119, 1998.

SPINA, D. Epithelium Smooth muscle regulation and interactions. *Am J Respir Crit Care Med.* 158: S141-S145, 1998.

STEPHENS, J.; TURNER, M. S.; TRAUGER, J. W.; LOGRASSO P. Characterization and purification of truncated human Rho-kinase II expressed in Sf-21 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 405 (1): 13-20, 2002.

SZAREK, J. L.; SCHMIDT, N. L. Hydrogen peroxide-induced potentiation of contractile responses in isolated rat airways. *Am. J. Physiol., Lung Cell. Mol. Physiol.* 258, L232–L237, 1990.

SZYMONIK-LESIUK, S.; CZECHOWSKA, G.; STRYJECKA-ZIMMER, M.; SLOMKA, M.; MADRO, A.; CELINSKI, K.; WIELOSZ, M. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 10 (4): 309-315, 2003.

TIEPPO, J.; VERCELINO, R.; DIAS, A. S.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. *Arq Gastroenterol.* 42(4):244-8, 2006.

TURI J. L.; YANG, F.; GARRICK, M. D.; PIANTADOSI, C. A.; GHIO, A. J. The iron cycle and oxidative stress in the lung. *Free Radical Biology & Medicine.* 36: 850- 857, 2004.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. *Life Science.* 51 (14): 1083-1094, 1992.

VAN AELST, L.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Development.* 11(18), 2295-322. Review, 1997.

WEBB, R. C. Smooth Muscle Contraction and Relaxation. *Advances in Physiology Education*. 27 (4): 201-206, 2003.

WETTSCHURECK, N.; OFFERMANN S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*. 80(10): 629-638, 2002.

WILLIAMS, D. A.; FAY, F. S. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin 2. *Am. J. Physiol*. 250(5): 779 -791, 1986.

WOZNIAK, A.; WOZNIAK, B.; DREWA, G.; KASPRZAK, H. A. The effect of ascorbic acid and ethanol on the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in selected tissues of albino BALB/c mice. *Biol. Pharm. Bull*. 25: 943-944, 2002.

YOSHIDA, W. B.; CAMPOS, E. B. P. Ischemia and reperfusion and: effects of mannitol and vitamin C in reducing necrosis area in a rat experimental model. *Acta Cirurgica Brasileira*. 20: 358-363, 2005.

YU, B. P. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews*. 71(1): 139-162, 1994.

ZOU, C. G.; AGAR, N. S.; JONES G. L. Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sciences*. 69 (1): 75-86, 2001.

## ANEXOS

TABELA 1 - Efeito do AAPH sobre o acoplamento farmacomecânico (concentração 10 µM de Ach) em músculo traqueal, com e sem a preservação do epitélio

AAPH (mM)	Músculo liso traqueal com a preservação do epitélio (g) (n=10)	p	Músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio (g) (n=9)	p
MC	0,7295 ± 0,066		1,0035 ± 0,167	
0,01	0,7379 ± 0,091	0,01	0,9113 ± 0,116	ns
0,03	0,7411 ± 0,097	0,03	0,8836 ± 0,097	ns
0,1	0,7251 ± 0,098	ns	0,8898 ± 0,098	ns
0,3	0,7916 ± 0,122	0,01	0,9879 ± 0,099	ns
1	1,0210 ± 0,117	< 0,001	1,1433 ± 0,148	0,01
3	1,1080 ± 0,122	< 0,001	1,1233 ± 0,144	ns
10	1,2019 ± 0,152	< 0,001	1,1223 ± 0,252	ns
30	1,1368 ± 0,141	< 0,001	0,9283 ± 0,254	ns
60	0,9230 ± 0,127	< 0,001	0,6168 ± 0,196	0,02
100	0,3649 ± 0,047	< 0,001	0,2174 ± 0,083	0,001
200	0,0120 ± 0,005	< 0,001	0,0012 ± 0,016	0,001

NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. – Two way ANOVA. MC= média do controle; ns = não significante e p = nível de significância em relação ao controle.

TABELA 2 - Efeito potencializador do AAPH (EC<sub>50</sub>) sobre a contração submaximal de acetilcolina na faixa de concentração entre 0,01 a 10 mM

Protocolo / Efeito	EC <sub>50</sub>	p
AAPH sobre a contração de Ach com preservação do EPT (n=10) (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 mM)	[0,8776 ± 0,415] mM	< 0,05
AAPH sobre a contração de Ach sem preservação do EPT (n=9) (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, e 1 mM)	[0,3388 ± 0,343] mM	ns

NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. da concentração em mM; p = nível de significância e ns = não significante.

TABELA 3 - Efeito inibidor do AAPH (EC<sub>50</sub>) sobre a contração submaximal de acetilcolina na faixa de concentração entre 1 a 200 mM

Protocolo / Efeito	EC <sub>50</sub>	p
AAPH sobre a contração de Ach com preservação do EPT (n=10) (10, 30, 60, 100 e 200 mM)	[81,5562 ± 4,284] mM	< 0,0001
AAPH sobre a contração de Ach sem preservação do EPT (n=9) (1, 3, 10, 30, 60, 100 e 200 mM)	[57,7786 ± 8,607] mM	< 0,0001

NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. da concentração em mM e p = nível de significância.

TABELA 4 - Efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico (concentração 60 mM de potássio) em músculo traqueal, com e sem a preservação do epitélio

AAPH (mM)	Músculo liso traqueal com a preservação do epitélio (g) (n=7)	p	Músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio (g) (n=9)	p
MC	0,8162 ± 0,053		1,2764 ± 0,106	
0,01	0,7343 ± 0,067	ns	0,9928 ± 0,094	ns
0,03	0,7355 ± 0,063	ns	0,9595 ± 0,072	ns
0,1	0,7413 ± 0,060	ns	0,9025 ± 0,118	ns
0,3	0,7055 ± 0,056	ns	0,8610 ± 0,149	ns
1	0,7866 ± 0,061	ns	1,2135 ± 0,093	ns
3	0,7792 ± 0,052	ns	1,0651 ± 0,086	ns
10	0,6748 ± 0,048	0,001	1,0602 ± 0,106	ns
30	0,6209 ± 0,040	0,001	0,7016 ± 0,076	0,000
60	0,3661 ± 0,052	0,001	0,1882 ± 0,020	0,000
100	0,0974 ± 0,003	0,001	0,0936 ± 0,010	0,000
200	0,0152 ± 0,007	0,001	-0,0040 ± 0,001	0,000

NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. – Two way ANOVA. MC= média do controle; ns = não significante e p = nível de significância em relação ao controle.

TABELA 5 - Efeito do AAPH (EC<sub>50</sub>) sobre a contração de potássio na faixa de concentração entre 0,01 a 200 mM

Protocolo / Efeito	EC <sub>50</sub>	p
AAPH sobre a contração de K <sup>+</sup> com preservação do EPT (n=7)	[57,4037 ± 4,652 mM]	< 0,001
AAPH sobre a contração de K <sup>+</sup> sem preservação do EPT (n=9)	[32,9650 ± 2,652 mM]	< 0,001

NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. da concentração em mM e p = nível de significância.

TABELA 6 - Efeito do AAPH sobre o tônus basal em músculo traqueal, com e sem a preservação do epitélio, na presença e ausência da indometacina

AAPH (mM)	Músculo liso traqueal com a preservação do epitélio (n=11)	Músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio (n=11)	Músculo liso traqueal com a preservação do epitélio + IND (n=9)	Músculo liso traqueal sem a preservação do epitélio + IND (n=11)
MC	0,7912 ± 0,061	1,0994 ± 0,127	1,0063 ± 0,089	1,1856 ± 0,075
0,1	0,0028 ± 0,004	-0,0018 ± 0,003	-0,0057 ± 0,002	-0,0333 ± 0,029
0,3	0,0180 ± 0,014	0,0100 ± 0,004	-0,0047 ± 0,007	0,0023 ± 0,004
1	0,2660 ± 0,072	0,4212 ± 0,086	0,7630 ± 0,102	0,4916 ± 0,134
3	0,3183 ± 0,101	0,3923 ± 0,089	0,9032 ± 0,122	0,8720 ± 0,108
10	0,1987 ± 0,059	0,3127 ± 0,042	0,6595 ± 0,129	0,3990 ± 0,098
30	0,0127 ± 0,017	0,0334 ± 0,016	0,0771 ± 0,021	0,0140 ± 0,076
60	0,0450 ± 0,018	0,0016 ± 0,005	0,1162 ± 0,021	0,0303 ± 0,013
100	0,2137 ± 0,033	0,1118 ± 0,019	0,3520 ± 0,046	0,2187 ± 0,024
200	0,1471 ± 0,033	0,0643 ± 0,026	0,1458 ± 0,026	0,0886 ± 0,027

NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. MC= média do controle.

TABELA 7 - Efeito do AAPH sobre o tônus basal em músculo traqueal, com e sem a preservação do epitélio, na presença da indometacina, Y27632 e nifedipina

AAPH mM	Traquéia sem a preservação do epitélio + IND (g) (n=11)	Traquéia sem a preservação do epitélio + IND + Y27632 (g) (n=5)	Traquéia sem a preservação do epitélio + IND + NIF (g) (n=8)	Traquéia sem a preservação do epitélio + IND + Y27631 + NIF (g) (n=5)
MC	1,2090 ± 0,071	0,9220 ± 0,083	1,1619 ± 0,077	0,8880 ± 0,116
3	0,7616 ± 0,098	0,0236 ± 0,013	0,2692 ± 0,028	0,0200 ± 0,006

NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. MC= média do controle.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)