



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PATRÍCIA FERREIRA DA SILVA CASTRO

**Efeitos do novo doador de óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺
sobre o músculo liso traqueal de ratos com asma experimental.**

**Goiânia
2015**

PATRÍCIA FERREIRA DA SILVA CASTRO

**Efeitos do novo doador de óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺
sobre o músculo liso traqueal de ratos com asma experimental.**

Defesa da Tese de Doutorado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Goiás para
obtenção do Título Doutor em
Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Matheus Lavorenti Rocha

**Goiânia
2015**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Patrícia Ferreira da Silva Castro

Orientador: Dr. Matheus Lavorenti Rocha

Membros:

1. Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha (Presidente)

2. Prof^a. Dra. Luiza Cristina Lacerda Jacomini

3. Prof^a. Dra. Jaqueline Gleice A. Freitas

4. Prof^a. Dra. Kênnia Rocha Rezende

5. Prof. Dr. Elson Alves Costa

OU

6. Prof^a. Dra. Aline Carvalho Batista

7. Prof. Dr. Alisson Martins de Oliveira

Data: 26/03/2015

*A quem me faz conhecer a mim mesma. Meu amigo e
companheiro a 10 anos!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço com toda minha essência a Deus por me permitir o privilégio de desvendar uma pequenina parte de sua tão grandiosa criação! Agradeço a Ele por me sustentar, inspirar e me fazer mais paciente.

Agradeço ao Natan por fazer parte da minha vida cuidando, compreendendo, colaborando, incentivando e amando. Sem ele, este trabalho não aconteceria.

Muito obrigada aos meus pais, Dário e Tininha e minha vizinha Alícia, pela torcida, carinho e incentivo.

Muito obrigada à minha irmã Sâmela pelo ombro amigo, apoio e torcida sempre.

Agradeço ao Prof. Dr. Matheus Lavorenti Rocha por apostar no meu trabalho ao longo desses 6 anos de convívio, por confiar e compreender, por acreditar e contribuir para a minha formação, sendo de fato, orientador.

Obrigada pela Prof^a Dr^a. Marize C. V. Bozinis por se dispor a auxiliar e orientar.

Muito obrigada aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular pela convivência, ajuda e companheirismo! Sem vocês, os experimentos seriam sem graça!

Agradeço aos meus colegas da Ig. Presb. Vida, FUG, UNIVERSO e UNIEVANGÉLICA pelo carinho, incentivo e pela torcida.

Agradeço ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia e à Faculdade de Farmácia pela parceria e por proporcionar as condições de trabalho.

Agradeço à Fernanda Belatto pela disposição e ajuda de sempre;

Aos amigos queridos que perto ou longe torceram, acreditaram e agora se alegram com a finalização desse trabalho.

À banca de qualificação e defesa por se dispor a contribuir com minha formação e para a ciência.

Ao CNPq e FAPPEG por fazer desse projeto realidade.

“[Eu] Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho.”

C. S. Lewis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	TRATAMENTO DA ASMA	07
1.2	ÓXIDO NÍTRICO E VIAS AÉREAS	10
1.3	ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	13
1.4	HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA	16
2	OBJETIVOS	19
3	MÉTODOS	20
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	21
3.2	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	22
3.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA	23
3.4	REATIVIDADE DO MÚSCULO LISO DA TRAQUEIA	23
3.4.1	Efeito relaxante do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA pré-contraídos com carbacol	23
3.4.2	Participação da via NO/GCs/GMPc sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA	24
3.4.3	Participação dos diferentes inibidores seletivos de fosfodiesterase (PDE) sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA	24
3.4.4	Participação dos diferentes bloqueadores seletivos de canais para potássio sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA	25
3.4.5	Participação da bomba de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA	25
3.4.6	Participação do influxo de Ca²⁺ em presença de carbacol ou KCl 75 mM	25
3.4.7	Participação da via das ciclooxigenases e do antagonista de leucotrienos sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA	26
3.4.8	Efeito relaxante do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA em presença de sequestrador de ânions superóxido	26
3.5	EFEITO DO TERPY EM CORTES DE BRONQUÍOLOS ASMÁTICOS	27
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS	29
4.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA	29
4.2	EFEITO CONTRÁTIL DO CARBACOL SOBRE TRAQUEIAS DE RATOS	31

4.3	EFEITO RELAXANTE DO SNP E DO TERPY _____	32
4.4	EFEITO DE DIFERENTES INIBIDORES DA VIA GCs/GMP _c SOBRE O RELAXAMENTO DE TRAQUEIAS DO GRUPO SHAM E OVA _____	34
4.4.1	Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, ODQ _____	34
4.4.2	Efeito do inibidor não seletivo de fosfodiesterases, IBMX _____	36
4.4.3	Efeito do inibidor seletivo de fosfodiesterase 3, amrinona _____	38
4.4.4	Efeito do inibidor seletivo de fosfodiesterase 4, rolipram _____	40
4.4.5	Efeito do inibidor seletivo de fosfodiesterase 5, dipiridamol _____	42
4.5	EFEITO DE DIFERENTES BLOQUEADORES DE CANAIS PARA POTÁSSIO SOBRE O RELAXAMENTO DE TRAQUEIAS DO GRUPO SHAM E OVA _____	44
4.5.1	Efeito do bloqueador não seletivo dos canais de potássio, tetraetilamônio (TEA) _____	44
4.5.2	Efeito do bloqueador dos canais para K⁺ tipo retificador (K_{IR}), BaCl₂ _____	47
4.5.3	Efeito do bloqueador dos canais para K⁺ dependentes de ATP (K_{ATP}), glibenclamida _____	49
4.5.4	Efeito do bloqueador dos canais para K⁺ dependente de voltagem (K_v), 4-aminopiridina (4-AP) _____	51
4.5.5	Efeito do bloqueador dos canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ (K_{Ca}), clotrimazol _____	53
4.5.6	Efeito do bloqueador dos canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de baixa condutância (SK_{Ca}), apamina _____	56
4.6	EFEITO DO INIBIDOR DA CÁLCIO-ATPASE DO RETÍCULO SARCOPLAMÁTICO, ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO (CPA) _____	57
4.7	EFEITO DO SNP E DO TERPY SOBRE A CONTRAÇÃO EXERCIDA POR KCl 75 mM OU CARBACOL 0,5 μM EM TRAQUEIAS DO GRUPO SHAM E OVA _____	59
4.7.1	Em presença de KCl 75 mM _____	59
4.7.2	Em presença de 0,5 μM de carbacol _____	62
4.8	EFEITO DE DIFERENTES INIBIDORES DA INFLAMAÇÃO SOBRE O RELAXAMENTO DO SNP E DO TERPY EM TRAQUEIAS DE RATOS DOS GRUPOS SHAM E OVA _____	63
4.8.1	Efeito do inibidor das ciclooxygenases, diclofenaco _____	63
4.8.2	Efeito do antagonista dos receptores de leucotrienos, montelukaste _____	66
4.8.3	Efeito do sequestrador dos ânions superóxidos, TIRON _____	68
4.9	RELAXAMENTO BRONQUIOLAR INDUZIDO PELO TERPY _____	71
5	DISCUSSÃO _____	72
5.1	MECANISMOS INTRACELULARES DE RELAXAMENTO _____	72
5.2	MECANISMOS INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS _____	90
6	CONCLUSÕES _____	94

REFERÊNCIAS	96
ANEXOS	109

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

LISTA DE TABELAS	PÁGINA
Tabela 1: Efeito máximo (E_{max}) e potência (pD_2) do SNP e TERPY nos grupos Sham e OVA na ausência (controle) e presença de diferentes ferramentas farmacológicas.	36
Tabela 2: Efeito máximo (E_{max}) e potência (pD_2) do SNP e TERPY nos grupos Sham e OVA na ausência (controle) e presença de diferentes ferramentas farmacológicas.	47
Tabela 3: Efeito máximo (E_{max}) e potência (pD_2) do SNP e TERPY nos grupos Sham e OVA na ausência (controle) e presença de diferentes ferramentas farmacológicas.	66

LISTA DE FIGURAS	
Figura 1: As complexas interações celulares neurais presentes na patogenia da asma resultam em manutenção da inflamação e conduzem ao remodelamento brônquico.	06
Figura 2: Mecanismo de ação do NO em músculo liso traqueal.	11
Figura 3: Estrutura química (A) e Cronoamperograma (B) do TERPY.	20
Figura 4: Representação dos experimentos de reatividade traqueal.	22
Figura 5: Fotomicroscopias de cortes histológicos transversais de traqueias de ratos Sham.	29
Figura 6: Fotomicroscopias de cortes histológicos transversais de traqueias de ratos do grupo Sham (A-D) e do grupo OVA (E-H) e gráfico de contração (I).	30
Figura 7: Comparação entre as respostas contrateis das traqueias isoladas de ratos dos grupos Sham e OVA.	32
Figura 8: Comparação entre o efeito relaxante do SNP e do TERPY em traqueias isoladas de ratos não sensibilizados (Sham) e sensibilizados com ovalbumina (OVA) e pré-contraídas com carbacol.	33
Figura 9: Efeito do ODQ sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	34
Figura 10: Efeito do IBMX sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	37
Figura 11: Efeito da amrinona sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	39
Figura 12: Efeito do rolipram sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	41

Figura 13: Efeito do dipiridamol sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	43
Figura 14: Efeito do TEA sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	45
Figura 15: Efeito do bário sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	48
Figura 16: Efeito da glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	50
Figura 17: Efeito da 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	52
Figura 18: Efeito do clotrimazol sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	54
Figura 19: Efeito da apamina sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	56
Figura 20: Efeito do CPA sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	58
Figura 21: Curva de contração induzida por concentrações crescentes de Ca ²⁺ em presença de KCl 75 mM em solução de Krebs a zero Ca ²⁺ em traqueias isoladas de ratos dos grupos Sham e OVA.	60
Figura 22: Contração máxima da curva para Ca ²⁺ nos grupos Sham e OVA em presença de KCl 75 mM em solução de Krebs a zero Ca ²⁺ .	61
Figura 23: Curva de contração induzida por concentrações crescentes de Ca ²⁺ em presença de carbacol 0,5 µM em solução de Krebs a zero Ca ²⁺ em traqueias isoladas de ratos dos grupos Sham e OVA.	62
Figura 24: Contração máxima da curva para Ca ²⁺ no grupo Sham e OVA em presença de carbacol 0,5 µM em solução de Krebs a zero Ca ²⁺ .	63
Figura 25: Efeito do diclofenaco sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	64
Figura 26: Efeito do montelucaste sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	67
Figura 27: Efeito do TIRON sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.	69
Figura 28: Fotomicroscopia da luz bronquiolar de rato do grupo OVA antes da adição do carbacol, em presença deste carbacol e de TERPY.	71
Figura 29: Mecanismo de ação do TERPY em traqueias de ratos do grupo OVA.	88
Figura 30: Mecanismo de ação do TERPY em traqueias de ratos do grupo Sham.	88
Figura 31: Mecanismo de ação do SNP em traqueias de ratos do grupo OVA.	89
Figura 32: Mecanismo de ação do SNP em traqueias de ratos do grupo Sham	89

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	109
Anexo 2 – Artigo submetido	113

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

2R-1C	Dois rins um clip
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de Ca ²⁺
4-AP	4-Aminopiridina
BaCl ₂	Cloreto de Bário
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
EC ₅₀	Concentração que promove 50% da resposta máxima
EC ₁₀₀	Concentração que promove 100% da resposta máxima
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMP _c	Guanosina monofosfato cíclico
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
K _{ATP}	Canais de potássio dependentes de ATP
K _{Ca}	Canais de potássio ativados por Ca ²⁺
KCl	Cloreto de potássio
K _{ir}	Canais de potássio retificadores
K _v	Canais de potássio dependentes de voltagem

NANC	Neurônios Não Adrenérgico e Não Colinérgico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
ODQ	1H-[1,2,4]oxidazol[4,3-a]quinoxaline1-one
pD ₂	Potência (-log EC ₅₀)
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PLC	Fosfolipase C
ppm	Parte por milhão
RNS	Radicais livres de nitrogênio
RS	Retículo sarcoplasmático
ROS	Radicais livres de oxigênio
SK _{Ca}	Canal de potássio regulados por cálcio de baixa condutância
SOCC	Canal de cálcio regulado por estoque
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEA	Tetraetilamônio
TERPY	[Ru(terpy)(bdq)NO ⁺] ³⁺
VOCC	Canal de cálcio regulado por voltagem

O óxido nítrico é um potente broncodilatador e compostos capazes de aumentar a sua oferta têm demonstrado interesse clínico no tratamento das doenças obstrutivas das vias aéreas. Este trabalho avaliou comparativamente os mecanismos de relaxamento de dois doadores de óxido nítrico, o complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) e o nitroprussiato de sódio (SNP) em traqueias isoladas de ratos saudáveis, grupo Sham, e com asma experimental induzida por ovalbumina, grupo OVA. As traqueias isoladas foram cortadas em anéis, montadas em banho para órgãos isolados e contraída com carbacol para estudo do relaxamento. O efeito relaxante do TERPY e do SNP foi avaliado em concentrações crescentes e cumulativas (10 nM a 100 μM). Foi verificada a participação dos diferentes tipos de canais de K^+ , a participação da via GCs/GMPc, inibição das PDEs (pelo IBMX, amrinona, rolipram e dipiridamol), a participação dos estoques internos de Ca^{2+} (pelo ácido ciclopiazônico), assim como a participação do influxo deste íon pelos canais de cálcio controlados por estoque e por voltagem, além da inibição da COX (pelo diclofenaco), do antagonismo dos receptores de leucotrienos (pelo montelucaste) e do sequestro dos íons superóxidos (pelo TIRON). Foram realizadas análises em microscopia de luz para comprovação da presença de infiltrado inflamatório e da broncodilatação exercida pelo TERPY em cortes de bronquíolos de animais asmáticos. Como resultados, verificou-se que a sensibilização com ovalbumina levou a um intenso processo inflamatório com migração celular e hiperreatividade ao carbacol. Evidenciou-se que o TERPY e o SNP relaxaram o músculo liso traqueal de forma concentração-dependente em ambos os grupos. Entretanto, o efeito máximo induzido pelo TERPY foi maior do que o do SNP tanto no grupo Sham quanto no OVA. O mecanismo de relaxamento do TERPY mostrou-se diferente entre os grupos. No grupo Sham, o TERPY exerce relaxamento por ativação dos canais K_v , K_{ir} , K_{Ca} e K_{ATP} independentemente de GMPc e por redução do influxo de cálcio através do bloqueio dos canais de cálcio operados por voltagem e por estoque. No grupo OVA, o TERPY exerce seu efeito através da ativação dos canais K^+ , via NO/GCs/GMP e redução do influxo de cálcio por bloqueio dos canais de cálcio operados por voltagem e operados por estoque. O efeito relaxante do SNP no grupo OVA ocorre através da ativação da via NO/GCs/GMPc, dos canais K_v , K_{Ca} e SK_{Ca} e por redução do influxo de cálcio pelos canais de cálcio operados por voltagem e operados por estoque. Entretanto, a ativação da enzima GCs parece estar reduzida em músculo liso inflamado, assim como o papel da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático. O diclofenaco, o montelucaste e o TIRON melhoraram o perfil de relaxamento tanto do TERPY quanto do SNP no grupo OVA. O TERPY é capaz de reverter a contração do carbacol em bronquíolos asmáticos. Em conclusão, tanto o SNP quanto o TERPY têm seus mecanismos de relaxamento modificados pelo processo inflamatório. Entretanto, esta modificação não foi capaz de alterar os parâmetros farmacológicos de potência e eficácia do TERPY. Já o SNP, tem menor eficácia em traqueias de ratos do grupo OVA e isso pode decorrer da

menor participação da enzima GCs e da bomba de cálcio reticular, fazendo do TERPY uma droga promissora para reversão do estreitamento das vias aéreas.

Palavras-chaves: Óxido nítrico, asma, compostos de rutênio, traqueia, canais de potássio, guanilato ciclase.

Nitric oxide is a potent bronchodilator and compounds capable of increasing its supply have demonstrated clinical interest in the treatment of obstructive airways diseases. This study evaluated and compared the mechanisms of relaxation of two nitric oxide donors, ruthenium complex [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺ (TERPY) and sodium nitroprusside (SNP) in healthy isolated trachea, Sham group, or experimental model of asthma induced by ovalbumin in rats, OVA group. The isolated trachea was sectioned into rings and contracted with carbachol in an organ chamber for studying relaxation. The relaxing effect of TERPY and SNP was evaluated at increasing concentrations from 10 nM to 100 μM. Thus, we verified the contribution of the different types of K⁺ channels, the importance of sGC/cGMP pathway, the inhibition of PDEs (for IBMX, amrinone, rolipram and dipyridamole), the influence of the extra and intracellular Ca²⁺ sources (for cyclopiazonic acid) and the influence of the store and voltage operated calcium channels. Besides inhibition of COX (diclofenac), antagonism of leukotriene receptor (montelukast) and superoxide anion scavenger (TIRON). Analyses were performed under light microscopy for evidence of inflammatory infiltration and bronchodilation by TERPY in slices bronchioles of asthmatic animals. The results verified that sensitization with ovalbumin led to intense inflammatory process and hyperresponsives to carbachol in compared Sham group. TERPY and SNP led to the relaxation of tracheal smooth muscle preparations in a dependent-concentration mode in both groups. However, the maximum effect induced by TERPY was higher than the effect of SNP in Sham and OVA groups. The relaxation mechanism of TERPY in both groups showed differences. In Sham group, TERPY relaxation by the activation of K_v, K_{ir}, K_{Ca} and K_{ATP} channels, cGMP-independent mechanisms and by reduction of calcium influx by blocking the store and voltage operated calcium channels. In OVA group, TERPY acts through activation K⁺ channels, NO/GCs/GMP way and blocking the store and voltage operated calcium channels. The relaxing effect induced by SNP in OVA group was dependent of NO/GCs/GMP pathway, K_v, K_{Ca} and BK_{Ca} channels and blocking the store and voltage operated calcium channels. However, the activation of the enzyme sGC seems to be reduced in inflamed smooth muscle, as well as the role of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Diclofenac, montelukast and TIRON improved relaxation of the TERPY and SNP in OVA group. The TERPY is able to reverse the contraction of carbachol in asthmatic bronchioles. In conclusion, TERPY and SNP have their mechanisms of relaxation modified by the inflammatory process. However, this modification was not able to alter the pharmacological parameters potency and efficacy to TERPY. Since SNP has less efficacy effect in asthmatic tracheas. This may result from the lower participation of the enzyme sGC and reticular calcium pump, making TERPY a promising drug to reverse the narrowing of the airways.

Keywords: Nitric oxide, asthma, ruthenium compounds, trachea, potassium channels, guanylate cyclase.

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença respiratória de definição bem estabelecida entre as autoridades de saúde no Brasil e no mundo. A Estratégia Global para Manejo e Prevenção da Asma de 2014 define asma como:

(...) uma doença heterogênea, usualmente caracterizada pela inflamação nas vias aéreas. É definida pelo histórico dos sintomas respiratórios, bem como chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse que variam ao longo do tempo e em intensidade, juntamente com limitação variável do fluxo aéreo (GINA, 2014).

A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma (2012), define asma como

(...) uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células e elementos celulares têm participação. A inflamação crônica está associada à hiperresponsividade das vias aéreas, que leva a episódios recorrentes de sibilos, dispneia, opressão torácica e tosse, particularmente à noite ou no início da manhã. Esses episódios são uma consequência da obstrução ao fluxo aéreo intrapulmonar generalizada e variável, reversível espontaneamente ou com tratamento.

A asma é uma doença respiratória com grande e variável prevalência. É uma das principais doenças não transmissíveis com cerca de 300 milhões de asmáticos, sendo a maioria delas crianças (GINA, 2014; OMS, 2014). Dados recentes estimam que a prevalência mundial varia entre 1,7 e 15,4%, estando Albânia e a China entre os países com as menores prevalências (1,7 e 1,8%, respectivamente) e El Salvador e Austrália com as maiores (15,4 e 15,4%, respectivamente) (GINA, 2014). Estes dados mostram que o Brasil apresenta 9,4% de sua população com asma. Considerando esta prevalência, acredita-se que o Brasil tenha cerca de 20 milhões de asmáticos (SOLÉ et al., 2006; SOLÉ et al., 2007).

Em 1996, os custos do Sistema Único de Saúde com internações por asma foram de 76 milhões de reais, 2,8% do gasto total anual com

internações e o terceiro maior valor gasto com uma única doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2006). Já em 2013 (BRASIL, 2014) ocorreram cerca de 135.000 internações por asma no Brasil e os custos para o Sistema Único de Saúde foram de 72 milhões de reais, 0,57% do gasto total anual com internações.

O estudo multicêntrico *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC III) (SOLÉ et al., 2006) avaliou a prevalência média mundial de asma em crianças e observou que o sintoma de chiado no peito é de 13,7% na faixa etária de 13-14 anos e de 11,6% na faixa etária entre 6 e 7 anos. Os resultados desse estudo indicam ainda que as diferenças internacionais na prevalência de sintomas de asma têm reduzido, particularmente na faixa etária de 13-14 anos; houve uma diminuição da prevalência em países de língua inglesa e na Europa Ocidental e aumentos na prevalência em regiões onde ela era previamente baixa. Este estudo demonstrou também que o percentual de crianças que relataram ter tido asma aumentou significativamente, possivelmente refletindo uma maior consciência desta condição e/ou mudanças na prática de diagnóstico. Por fim, o ISAAC III evidenciou que houve aumento na prevalência de sintomas da asma na África, América Latina e partes da Ásia, indicando que a carga global de asma continua a aumentar.

No Brasil, a prevalência de asma ativa variou, no período de 1995 a 2002, de 21,3% para 24,4% (PEARCE et al., 2007). Entretanto, apenas cinco cidades participaram das duas fases do ISAAC, e nelas houve uma redução na prevalência de sintomas de asma entre os adolescentes (27,7 versus 19,9%). O estudo ISAAC III demonstra prevalência média entre os adolescentes brasileiros próxima de 20% (CHONG NETO, ROSÁRIO, SOLÉ, 2012).

Nove anos após o estudo ISAAC Fase 3, entre 2011 e 2012, um novo levantamento sobre a prevalência da asma em adolescentes (13-14 anos) foi realizado em sete capitais brasileiras, Aracaju, Belém, Belo Horizonte, Curitiba, Maceió, Recife e São Paulo. Este estudo demonstrou que em relação ao ISAAC Fase 3, houve queda da prevalência média de asma ativa, saindo de 18,5% para 17,5%, com elevação da frequência de asma

grave (4,5% vs 4,7%) e da asma diagnosticada por médico (14,3% vs.17,6%) (SOLÉ et al., 2014a).

Um estudo transversal realizado pelo Ministério da Saúde do Brasil no ano de 2012 com escolares do nono ano (média de 14 anos) mostrou que a prevalência de sintomas de asma (chiado no peito nos últimos 12 meses) no país foi de 23,2%, variando de 24,9% na região Sudeste a 19,8% na Região Nordeste. Nas capitais, a prevalência de sintomas de asma foi de 25,2% variando de 18,2% em São Luís (MA) a 29,5% em São Paulo (SP). Relataram ter tido diagnóstico de asma alguma vez na vida 12,4% dos discentes entrevistados, variando de 18,4% na Região Norte a 11,4% na Região Sudeste. Entre as capitais, a média foi de 16% tendo variado de 29,3% em Porto Alegre a 12,2% em Cuiabá. A cidade de Goiânia apresentou uma prevalência de 25,5% de relatos de chiado no peito e de 12,4% daqueles que tiveram diagnóstico de asma alguma vez na vida (BARRETO et al., 2014).

No Brasil, os estudos epidemiológicos sobre a asma demonstram que ela é uma doença de alta prevalência e impacto em crianças e adolescentes, que apresenta importantes variações regionais, ainda não bem esclarecidas, assim como diversos fatores de risco, devendo portanto, ser encarada como um problema de Saúde Pública (SOLÉ et al., 2014b).

Os dados epidemiológicos demonstram uma redução da prevalência e da mortalidade pela asma nas últimas décadas, muito em razão dos estudos para desvendar sua fisiopatologia e da popularização das formas de prevenção e tratamento. A asma é uma doença complexa em que tanto fatores genéticos como ambientais estão envolvidos. A interação entre a predisposição genética e os fatores ambientais pode ter um papel importante na etiologia e prognóstico da doença. Os fatores ambientais que podem deflagrar uma crise asmática são diversos, dentre eles pólen de flores, poluição, fumaça de cigarro, infecção, dieta, dentre outros (HOLT e SLY, 2007).

Estudos epidemiológicos têm identificado uma série de fatores que aumentam a probabilidade de desenvolver asma, particularmente nos primeiros anos de vida, infecções respiratórias virais e exposição repetida a alérgenos parecem ter efeito sinérgico (HOLT e SLY, 2007).

O controle neural das vias aéreas é complexo e parece ser mediado por nervos autonômicos que regulam aspectos da função das vias aéreas incluindo o tônus do músculo liso, secreção, fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular e a migração de células inflamatórias. O controle das vias respiratórias ocorre através de inervação aferente, sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático e dos neurônios não adrenérgico e não colinérgico (NANC). NA inervação eferente, existem três tipos de regulação: os receptores de estiramento de adaptação lenta, as fibras C sensoriais não mielinizadas e os receptores de irritação de adaptação rápida associada às fibras vagais mielinizadas. Essas duas últimas inervações podem ser estimuladas por compostos químicos ou através de mediadores da inflamação, provocando o reflexo para tosse, broncoconstrição e aumento da secreção de muco (BARNES, 1995b).

A participação simpática no controle da respiração se dá, especialmente, por receptores β_2 presentes no músculo liso, epitélio, glândulas, alvéolos e mastócitos (GOYAL, JASEJA e VERMA, 2010, BARNES, 1995b). A ação desse receptor levando ao relaxamento das vias aéreas ocorre pelas catecolaminas circulantes, já que não há inervação simpática direta no músculo liso brônquico. A inervação simpática está presente nos vasos sanguíneos e glândulas. O efeito relaxante e o aumento da depuração mucociliar são efeitos da ativação dos receptores β_2 por agonistas como noradrenalina, adrenalina, terbutalina, salbutamol, dentre outros (BARNES, 1995b). Os receptores β_2 são ligados a proteína G e quando são ativados por agonistas, a subunidade α da proteína G ativa adenilato ciclase. Esta, é capaz de transformar ATP em AMPc e este segundo mensageiro leva a vários efeitos celulares, incluindo desfosforilação da cadeia leve de miosina impedindo o acoplamento com actina e conseqüentemente, levando ao relaxamento do músculo liso (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; BARNES, 1995a,b).

A participação parassimpática é evidenciada pela ação dos receptores muscarínicos, principalmente os M_3 , que estão presentes no músculo liso e quando ativados, levam à broncoconstrição (BARNES, 1995). Os receptores muscarínicos são metabotrópicos, isto é, acoplados à proteína

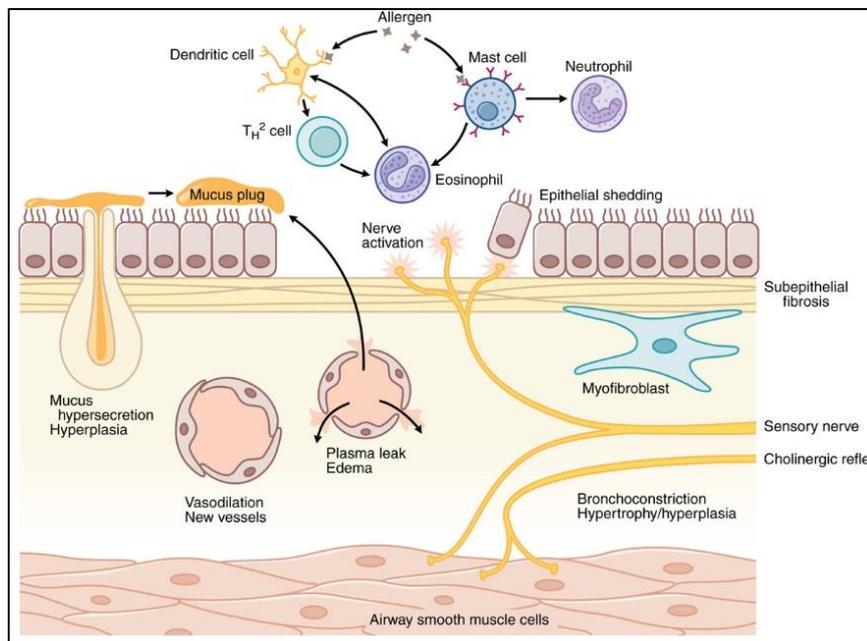
G e a contração brônquica exercida pelo receptor M_3 está ligada a segundos mensageiros que levam ao aumento citosólico das concentrações de cálcio. Quando ativado por um agonista, o receptor M_3 induz a subunidade α da proteína G a ativar a fosfolipase C. Esta produz diacilglicerol (DAG), que por sua vez leva à ativação de proteína quinase C (PKC) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que ativa liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (GOYAL, JASEJA e VERMA, 2010; FLORES-SOTO et al., 2013).

As fibras nervosas NANC também regulam as vias aéreas. Esses neurônios liberam neurotransmissores como o NO, a substância P e a neurocinina A. O NO é o principal neurotransmissor relaxante e os dois últimos são excitatórios levando ao aumento da permeabilidade vascular e ao espasmo, respectivamente (GOLAN, 2009; BARNES, 1995b).

A asma é caracterizada como um processo inflamatório crônico das vias aéreas que tem em seu sinal máximo o estreitamento das vias respiratórias e a sua patogênese é atribuída à hiperresponsividade desse sistema (GOLAN, 2009).

Patologicamente, o processo inflamatório da asma possui características peculiares entre as inflamações pulmonares. Ela apresenta inflamação crônica a partir das vias aéreas centrais (traqueia) para as periféricas (bronquíolos), aumento do número de células inflamatórias como basófilos, eosinófilos, linfócitos T, macrófago e neutrófilos como esquematizado na Fig. 1. Os basófilos parecem ter certa responsabilidade sobre a hiperreação, os eosinófilos são as células inflamatórias em maior abundância, os linfócitos secretam interleucinas específicas para recrutar mais eosinófilos e a produção de IgE pelos linfócitos B, os macrófagos amplificam a resposta inflamatória pela ligação de baixa afinidade com IgE e os neutrófilos são encontrados em grande número no escarro de pacientes com asma grave, asmáticos fumante, mas o seu papel ainda é desconhecido (ICHINOSE, 2009; GOLAN, 2009; LI et al., 2000).

Figura 1- As complexas interações celulares neurais presentes na patogenia da asma resultam em manutenção da inflamação e conduzem ao remodelamento brônquico.



Fonte: BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012.

No processo inflamatório da asma, os principais mediadores pró-inflamatórios e broncoconstritores derivados de mastócitos e eosinófilos são os leucotrienos. Juntos com estes, histamina e prostaglandinas liberadas por mastócitos são os principais moduladores do tônus das vias aéreas na asma (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; GOLAN, 2009).

Um outro fator que contribui para a exacerbação do processo inflamatório na asma é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente o íon superóxido (O_2^-) (BARNES, 1990) decorrente da desregulação das enzimas xantina oxidase nas células endoteliais microvasculares e NADPH oxidase no infiltrado eosinofílico (enzimas responsáveis pela eliminação dessas espécies reativas) (SEDGWICK, 1995) e o aumento da produção de óxido nítrico (NO) (NATHAN, 1992) por conta do aumento da expressão de enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (HAMID et al., 1993). O NO reage rapidamente com o O_2^- produzido por células inflamatórias e forma peroxinitrito ($ONOO^-$), um composto altamente pró-inflamatório (BECKMAN et al., 1990).

1.1 TRATAMENTO DA ASMA

Por se tratar de uma doença crônica, o tratamento da asma tem como objetivo o controle dos sintomas, prevenir a limitação crônica ao fluxo aéreo, permitir atividades normais aos pacientes, manter a função pulmonar normal ou a melhor possível, evitar crises agudas, reduzir a necessidade do uso de broncodilatador para alívio, minimizar efeitos adversos da medicação e prevenir óbitos (GINA, 2014).

A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2012), divide os medicamentos utilizados para asma em duas categorias: 1) fármacos para melhora dos sintomas agudos: β_2 -agonistas com rápido início de ação como salbutamol e terbutalina, antagonistas muscarínicos como o brometo de ipratrópio e inibidores de fosfodiesterases como a aminofilina e teofilina; 2) fármacos para manutenção, usados para prevenir os sintomas: corticosteroides inalatórios e sistêmicos como budesonida e beclometasona, cromonas como o cromoglicato dissódico, antagonistas de leucotrienos como o montelucaste, β_2 -agonistas de longa duração como o formoterol e teofilina de liberação lenta.

A utilização dos agonistas β_2 de curta ação (4 a 6 horas) como salbutamol, terbutalina e fenoterol, e dos de longa ação, como salmeterol e o formoterol (até 12 horas) é justificada pela sua ação sobre a musculatura lisa traqueal. A ativação do receptor β_2 presente no trato respiratório leva à broncodilatação através do aumento intracelular de AMPc (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; GOLAN, 2009; BARNES, 1995a).

Os β_2 -agonistas de curta duração estimulam domínios externos do receptor e são indicados para o alívio dos sintomas da asma, enquanto os de longa duração são fármacos que, associados à terapia de manutenção com corticosteroides inalatórios/sistêmicos, atuam para o melhor controle dos sintomas (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; GOLAN, 2009; BARNES, 1995a).

O fármaco anticolinérgico mais utilizado no Brasil para tratamento da asma é o brometo de ipratrópio. Sua utilização é justificada por reduzir do tônus colinérgico através do antagonismo dos receptores muscarínicos e redução da produção de muco nas vias aéreas. Entretanto, o efeito

broncodilatador dessa classe de medicamentos é menos potente se comparado aos agonistas β (ICHINOSE, 2009).

A aminofilina e a teofilina, do grupo das metilxantinas, podem ser utilizados para o resgate do paciente com crise asmática, mas são utilizadas, primordialmente, nos tratamentos profiláticos às dispneias. Porém, são broncodilatadores de baixa potência e elevado risco de efeito colateral. A tentativa de reduzir os principais efeitos colaterais como taquicardia, tremores, ansiedade e cefaleia é a utilização das formas de liberação controlada. A indicação das xantinas na asma se baseia na inibição das fosfodiesterases do trato respiratório, enzimas responsáveis por degradar GMPc e AMPc, conseqüentemente, o acúmulo desses nucleotídeos cíclicos nas células musculares culmina no relaxamento brônquico. Elas apresentam ainda discreta ação anti-inflamatória (SOCIEDADE..., 2012).

Os fármacos de primeira escolha para a manutenção dos pacientes com asma devem ser os corticosteróides. Os utilizados na forma inalatória, beclometasona, budesonida, mometasona, fluticasona e ciclesonida, apresentam a melhor relação custo/risco/benefício para asma persistente. A prednisona e prednisolona são utilizados sistemicamente por terem meia-vida intermediária e apresentarem menos efeitos colaterais (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; GOLAN, 2009).

A utilização dos corticosteroides é justificada pelos seus diversos mecanismos de ação. Os fármacos são transportados para o interior celular, atravessam a membrana que recobre o núcleo e se ligam a sequências de DNA induzindo ou suprimindo diversos genes envolvidos na produção de citocinas, moléculas de adesão e receptores importantes para o processo inflamatório. O tratamento com corticosteroides inalatórios reduz a expressão de RNAm para iNOS (SALEH et al., 1998), aumenta a expressão de lipocortina, proteína inibitória da fosfolipase A₂ e inibe da expressão de interleucinas que estimulam a migração e proliferação de células inflamatórias, levando, conseqüentemente, à redução da inflamação (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; GOLAN, 2009).

Os efeitos colaterais desses fármacos são bastantes frequentes e podem ser graves. A utilização sistêmica pode levar à supressão do eixo

hipotálamo/hipófise/adrenal pela semelhança estrutural com o cortisol e a suspensão da dose deve ser progressiva, pois a recuperação da adrenal pode ser lenta. A osteoporose é observada em pacientes com uso de corticosteroides (REED et al., 1998) e em idosos, há risco de catarata e glaucoma (CUMMING, MITCHELL e LEE- DSEE, 1997), adelgaçamento da pele e equimoses e a miopatia aguda pode ocorrer com altas doses de corticosteroides no tratamento da crise, particularmente se forem associados a bloqueadores neuromusculares (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012).

Outro grupo de medicamentos utilizado principalmente em crianças para tratamento da asma são as cromonas, especificamente o cromoglicato dissódico. São fármacos seguros e com poucos efeitos colaterais, entretanto, é modesta a redução da hiperresponsividade (ANDERSSON et al., 2001). O cromoglicato bloqueia os canais de cloreto da membrana celular dos mastócitos, eosinófilos, nervos e células epiteliais (ROSSI, 1995). Os canais de cloreto, fisiologicamente se mantêm fechados, mas abrem quando existe ativação celular, como entrada de cálcio e conseqüente degranulação dos mastócitos. As cromonas restauram os canais para a posição fechada, aumentando o limiar para sua ativação, sendo conhecido por “estabilizadores de mastócitos”.

Ainda de acordo com o III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma (2002), os medicamentos indicados para o tratamento da asma são os antagonistas de leucotrienos, representado atualmente no Brasil pelo montelucaste. Esse fármaco tem efeito broncodilatador modesto e lento se comparado aos β_2 -agonistas, mas pode ser utilizado juntamente com estes ou com corticosteroides, permitindo a redução da dose destes. A utilização prolongada dos antileucotrienos reduz a hiperresponsividade das vias aéreas.

Pode-se entender, portanto, que o grupo de fármacos mais potente e eficiente para a manutenção da asma é o dos corticoides. Embora, apresentem muitos efeitos colaterais em pacientes com asma grave e/ou persistente, há a necessidade de tratamento com glicocorticoides por períodos prolongados para se obter certo controle da doença.

O estresse por compostos nitroativos (peroxinitrito) e a nitração de proteínas no epitélio das vias respiratórias podem ser responsáveis pela resistência aos esteroides em casos de asma grave, a concentração de NO no ar exalado (KHARITONOV e BARNES, 2003), a expressão de iNOS e o infiltrado inflamatório estão aumentados no epitélio das vias aéreas na asma (SALEH et al., 1998). Esses fatos evidenciam a importância de desenvolver novas estratégias terapêuticas envolvendo o NO, como por exemplo utilização de inibidores seletivos de NOS, doadores de NO, inalação de NO, dentre outras (FOLKERTS e NIJKAMP, 2004).

1.2 ÓXIDO NITRICO E VIAS AÉREAS

Fisiologicamente o NO é biossintetizado pela oxidação de um dos dois grupamentos aminos da L-arginina, que é convertido em L-citrulina, sendo esta reação catalisada pela enzima NOS. Existem três isoformas da NOS e todas elas são expressas no trato respiratório, inclusive de humanos (REDINGTON, 2006; GUO et al., 1995). As isoformas nNOS (também conhecida como NOS-1) e eNOS (também conhecida como NOS-3) são constitutivas e expressas, primariamente, em células neuronais e endoteliais, respectivamente. Estas são altamente dependentes dos íons Ca^{2+} e de calmodulina para sua ativação. A terceira isoforma, iNOS ou NOS-2, é induzida por estímulo imunológico ou inflamatório (GASTON et al., 1994).

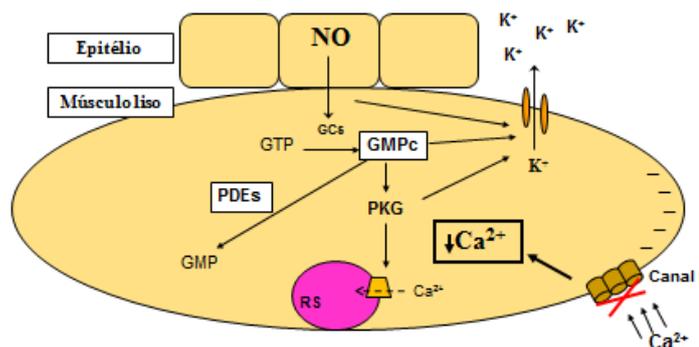
O NO regula o tônus e a homeostase vascular, controla o fluxo sanguíneo basal, atua sobre a contratilidade cardíaca e é o principal agente vasodilatador endógeno (FURCHGOTT, 1999; SHAH, 1996). Além dessas ações sobre o sistema cardiovascular, o NO promover o relaxamento das vias aéreas, mais especificamente, sobre o músculo liso traqueal, sendo o principal agente broncodilatador (FOLKERTS e NIJKAMP, 1998; STUART-SMITH et al., 1994; ZHOU e TORPHY, 1991).

A maior fonte de NO nas vias aéreas é o epitélio (FOLKERTS e NIJKAMP, 1998). Alguns estudos apontam a participação do NO produzido pelo epitélio traqueal em outros mecanismos como a regulação da frequência do batimento ciliar, o transporte de íons, a defesa antibacteriana e viral, secreção de muco e inibição da proliferação de células T (BOVE e VAN DER

VLIET, 2006). O relaxamento brônquico é mediado também pela liberação de NO pelo epitélio, que por sua vez, migra facilmente para células do músculo liso subjacente promovendo relaxamento (ELLIS, 1997).

Estudos realizados em músculo liso traqueal mostram que existem diversos alvos para o NO, mas o principal deles é a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (THIPPESWAMY et al., 2006). O mesmo ocorre em músculo liso brônquico e traqueal, onde a enzima GCs é o maior alvo do NO (REDINGTON, 2006; ELLIS, 1997). A ativação da GCs pelo NO eleva os níveis intracelulares de GMPc, que atua como um mensageiro intracelular amplificando a resposta celular (IGNARRO, 1991; ARNOLD et al., 1977) como pode ser visualizado na Fig. 2.

Figura 2- Mecanismo de ação do NO em músculo liso traqueal.



Fonte: Autoria própria baseada nos estudos de REDINGTON, 2006; FOLKERTS e NIJKAMP, 1998; ELLIS, 1997; PLANE et al., 1996; STUART-SMITH et al., 1994; IGNARRO, 1991; ARNOLD et al., 1977.

O principal alvo do GMPc é a família das proteínas quinases dependentes do GMPc, denominada proteína quinase G (PKG). A ativação da PKG e a consequente fosforilação de várias proteínas constitui uma cascata, que acarreta na redução da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) (MCDANIEL, et al., 1992), desfosforilação da cadeia leve de miosina (MURAD, 1986) e redução do aparato contrátil, desativando o complexo Ca^{2+} -calmodulina (KARAKI et al., 1988), além da ativação dos canais para K^+ , levando à hiperpolarização da membrana e inibição de canais para Ca^{2+} do tipo L ou operados por voltagem (MIYOSHI, NAKAYA e MORITOKI, 1994).

Entretanto, nem todos os estudos confirmam o papel da via GCs/GMPc/PKG mediando os efeitos relaxantes do NO e alguns autores têm

demonstrado que esse efeito pode ocorrer independentemente de GMPc e que o estímulo ao músculo liso pode se dar pela ativação direta dos canais para K⁺ pelo NO (REDINGTON, 2006; HOMER e WANSTALL, 2000; PLANE et al., 1996; STUART-SMITH et al., 1994; BOLOTINA et al., 1994).

Em particular para contração muscular, as fontes de Ca²⁺ podem ser de origem intracelular, extracelular ou ambas. Dessa forma, os íons Ca²⁺ são encontrados em quatro diferentes estoques: extracelular, citoplasmático, mitocondrial e não mitocondrial (retículo sarcoplasmático), sendo este considerado o principal estoque intracelular de Ca²⁺ (THOMAS et al., 1996).

Entre os estudiosos do sistema respiratório existe consenso sobre o efeito do NO sobre as vias respiratórias. Entretanto, há controvérsias quanto ao efeito terapêutico do NO. O estudo realizado por Sanna et al. (1994), demonstrou que a inalação de NO não tem efeito sobre o tônus das vias aéreas em voluntários saudáveis submetidos à broncoconstrição com metacolina. Já o estudo de Pfeffer et al. (1996), evidencia que o NO inalado não tem nenhum efeito broncodilatador em pacientes pediátricos com asma leve e doença de vias aéreas.

Ao contrário desses resultados, o estudo realizado por Högman et al. (1993), verifica um efeito broncodilatador na asma brônquica. Kacmarek et al. (1996), sugerem que a inalação de NO por pacientes com asma leve e broncoespasmo induzido pela metacolina resultam em um relaxamento significativo das vias aéreas.

O interesse nos possíveis benefícios terapêuticos do NO nas doenças das vias respiratórias vem de vários grupos de pesquisadores que defendem que o NO tem um papel broncoprotetor e que na asma há uma aparente perda desse efeito (REDINGTON, 2006). Estudos demonstraram que as baixas doses de NO são eficazes em reverter a vasoconstrição pulmonar. Esses resultados apontam para um importante papel do NO na modulação do tônus das vias aéreas (NIJKAMP e FOLKERTS, 1995). Ashutosh et al. (2000), demonstraram que o NO na concentração de 25 ppm misturado ao oxigênio pode ser administrado por cânula nasal por 24 horas, sem efeitos adversos significativos, e com redução da resistência vascular pulmonar em pacientes estáveis com doença pulmonar obstrutiva crônica, por períodos prolongados.

Corroborando ainda para os benefícios do tratamento de doenças pulmonares com o NO, Vonbank et al. (2003), verificaram que em pacientes ambulatoriais com doença pulmonar obstrutiva crônica, o fornecimento de gases por período prolongado é viável e que a suplementação com NO poderia ser administrada de forma segura e eficaz durante um período de três meses ou a longo prazo. Segundo Kharitonov (2005), o tratamento associando corticoides inalatórios e doadores de NO pode ser uma modalidade terapêutica no tratamento da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica.

1.3 ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O NO em condições fisiológicas, é muito instável e pode reagir quase que instantaneamente com moléculas que apresentem elétrons desemparelhados (MCINTYRE, BOHR e DOMINICZAK, 1999), radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-) e metais de transição como o átomo de ferro localizado no sítio heme de algumas proteínas. Esta alta reatividade explica o curto tempo de meia vida do NO, tanto *in vitro* (de aproximadamente 5 segundos) quanto *in vivo* (0,1 segundo) (NISHIDA et al., 1992). O metabolismo oxidativo do NO pode levar à rápida perda da atividade relaxante do NO sobre o músculo liso (HENRY et al., 1991; STAMLER, SINGEL e LOSCALZO, 1992).

Apesar de seus inconvenientes, doadores de NO como nitratos orgânicos e nitroprussiato de sódio têm sido utilizados na terapêutica durante muitos anos. Há aproximadamente 70 anos, esses compostos são conhecidos por induzir o relaxamento brônquico (GOODMAN e GILMAN, 1941). Uma nova abordagem tem se concentrado nos doadores de NO como novos agentes farmacológicos (REDINGTON, 2006), porém com efeitos adversos diminuídos.

Os doadores de NO, incluindo os mais utilizados na clínica médica, nitroglicerina e nitroprussiato de sódio (SNP), possuem importantes limitações em seu uso que se contrapõem aos seus benefícios. O SNP requer metabolização catalisada por enzimas presentes na membrana plasmática epitelial para liberar o NO (BATES et al., 1991). A liberação de NO por esse

fármaco é acompanhada pela liberação de cianeto como produto de biotransformação, o qual apresenta alta toxicidade ao organismo (BATES et al., 1991; ARNOLD, LONGNECKER e EPSTEIN, 1984). Além da formação de cianeto, a administração endovenosa de SNP leva a rápida e intensa queda da pressão arterial, com consequente taquicardia reflexa (YAKAZU et al., 2001). Estes efeitos são importantes fatores limitantes do uso terapêutico deste doador de NO, restringindo-o a condições hospitalares por exigirem suporte de emergência, principalmente devido à sua intensa vasodilatação e súbita queda da pressão arterial.

Lamarque e Whittle (1995), observaram que o SNP está envolvido na formação de O_2^- e Villa et al. (1994), relataram que esse ânion reage com o NO liberado pelo próprio SNP formando radicais livres de nitrogênio (NO_3^-). Esse composto é danoso e poderia ser responsável por gerar danos teciduais e ainda apoptose (ESTEVEZ et al., 1995). Com base nos efeitos tóxicos do SNP, alguns metalonitrosil-complexos têm sido utilizados como doadores de NO (WANG et al., 2000; BONAVENTURA et al., 2007).

Normalmente, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são rapidamente removidas antes que causem disfunção celular e morte celular eventual. Todos os organismos aeróbios utilizam antioxidantes para proteger-se dos danos oxidativos, além de numerosas enzimas que removem e/ou reparam os danos moleculares (COMHAIR e ERZURUM, 2002). Dentre as enzimas antioxidantes temos a superóxido dismutase, que transforma O_2^- em H_2O_2 ; a catalase, que tem atividade redutora sensível para pequenas moléculas, como H_2O_2 , metila ou hidroperóxido de etila. O sistema glutationa, especialmente a glutationa peroxidase, que é o mecanismo central para a redução do H_2O_2 e complementa a ação da catalase pela capacidade de eliminar outros peróxidos tóxicos e outras moléculas maiores como peróxidos lipídicos.

Além das enzimas existem outras substâncias que apresentam atividade antioxidante por serem sequestradoras de radicais livre, dentre elas temos a vitamina E (α -tocoferol) um antioxidante ligado à membrana que impede a reação em cadeia da peroxidase lipídica. Entretanto, em altas concentrações, a forma radicalar da vitamina E pode funcionar como um agente pró-oxidante (BAST, HAENEN e DOELMAN, 1991). A vitamina C pode

sequestrar O_2^- e OH^* e formar um radical livre que é eliminado pela glutathione redutase, entretanto, normalmente não é considerada um antioxidante importante porque também tem propriedades pró-oxidantes. Outros agentes antioxidantes incluem o β -caroteno como sequestrador de O_2^- e radicais peróxido, o ácido úrico por sequestrar também O_2^- e radicais peróxido além de radical hidroxil, dentre outros.

Os pulmões requerem quantidades adicionais de antioxidantes para manterem a integridade das células e do fluido de revestimento das células epiteliais (HEFFNER e REPINE, 1989). Esse fluido contém cerca de 100 vezes mais glutathione redutase do que no plasma, além de catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase com a finalidade de cumprir seu papel de barreira e proteção ao sistema respiratório (COMHAIR et al., 2000; SMITH, SHAMSUDDIN e SPORN, 1997; SMITH, HOUSTON e ANDERSON, 1993; CANTIN et al., 1987). Entretanto, um desequilíbrio nesse sistema de proteção pode resultar em uma série de eventos fisiopatológicos no pulmão que culminam em morte celular e disfunção pulmonar (HEFFNER e REPINE, 1989).

Durante o desenvolvimento das doenças pulmonares os antioxidantes apresentam respostas diferenciadas. Na asma, as células inflamatórias liberam grandes quantidades de agentes oxidantes, a enzima superóxido dismutase está reduzida nas células epiteliais brônquicas (SMITH, HOUSTON e ANDERSON, 1993; DE RAEVE et al., 1997), além dos níveis de glutathione redutase do fluido de revestimento das células epiteliais diminuem rapidamente em pacientes com asma leve durante uma crise (COMHAIR et al., 2000). Já a expressão da glutathione peroxidase sofre *upregulation* nas células epiteliais brônquicas e aumento da quantidade da enzima no fluido que as reveste como resultado do estresse oxidativo presente na asma (COMHAIR et al., 2001). Estudos mostraram que a glutathione peroxidase pode funcionar como uma redutase de radicais de nitrogênio evitando nitratação (FREEDMAN et al., 1995) e que doadores de NO (S-nitroso-N-acetil-D, L, penicilamina / GSNO) podem induzir a expressão do gene da glutathione peroxidase (eGPx) de forma dose-dependente (COMHAIR et al., 2002).

A suplementação com vitaminas antioxidantes E e C proporcionou proteção contra os efeitos danosos da exposição ao ozônio em cobaias

sensibilizadas com ovalbumina (CHHABRA et al., 2010) e em crianças asmáticas com uma baixa ingestão de vitamina E (SIENRA-MONGE et al., 2004). Assim, a utilização de um agente antioxidante pode ser um adjuvante importante para o tratamento da asma.

1.4 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

Dados da literatura demonstram que dentre as alternativas para aumentar a biodisponibilidade do NO estão a utilização de doadores de NO (BONAVENTURA et al., 2007) e a associação deste com agentes antioxidantes (RODRIGUES et al., 2008).

Dentre os compostos amplamente estudados, que são capazes de liberar NO, estão os complexos nitrosilados de rutênio. Esses complexos são interessantes devido à sua estabilidade térmica em pH fisiológico (SAUAIA et al., 2003). Outros estudos demonstraram que esses compostos possuem atividade biológica do tipo NO, como relaxamento do músculo liso vascular, queda da pressão arterial, inibição da agregação plaquetária e aumento dos níveis de GMPc (DE GAITANI et al., 2009; BONAVENTURA et al., 2007; LUNARDI et al., 2007; BONAVENTURA et al., 2004; WANG et al., 2000). O grupo de pesquisa do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, tem estudado vários destes complexos e demonstrado sua ação sobre vasos isolados e pressão arterial em experimentos *in vivo* (DE GAITANI et al., 2009; BONAVENTURA et al., 2004).

Já foi verificado por este grupo de pesquisa que o composto macrocíclico doador de NO [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺ (TERPY) é capaz de induzir relaxamento em anéis de aorta de ratos, envolvendo a liberação intracelular de NO[•] e NO⁻. Este relaxamento é menos potente que o relaxamento induzido pelo SNP, mas apresenta a mesma eficácia e envolve a ativação dos canais para K⁺ e a via GCs/GMPc, como observado por Bonaventura et al. (2007). A liberação de NO por este composto é acelerada na presença de luz, mas não degradada como ocorre com o SNP (DE LIMA et al., 2006). Verificou-se ainda que a ação relaxante do TERPY em aortas de ratos hipertensos pelo modelo dois rins um clip (2R-1C) tem o mesmo perfil de relaxamento de ratos

normotensos quando as artérias dos animais 2R-1C foram tratadas com um antioxidante como a vitamina C (RODRIGUES et al., 2008).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Faculdade de Farmácia da UFG avaliou o efeito do TERPY em traqueias isoladas de ratos saudáveis e verificou que este é mais eficaz do que o SNP em cerca de 45% em induzir o relaxamento de anéis de traqueias e que o mecanismo intracelular induzido pelo TERPY está ligado à influência no fluxo de íons K^+ e Ca^{2+} através da membrana e consequente redução da concentração intracelular de Ca^{2+} , independentemente da ação do GMPc (CASTRO et al., 2011).

Diante do interesse biológico/medicinal deste novo candidato a protótipo de fármaco doador de NO, foi estabelecido um trabalho de parceria entre o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Faculdade de Farmácia da UFG e o Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP para responder aos seguintes questionamentos: 1) Seria o TERPY capaz de provocar relaxamento em células musculares lisas das vias aéreas superiores em modelo de asma experimental em ratos? 2) Neste modelo, o TERPY continuaria a ser mais eficaz do que o SNP? 3) O mecanismo de ação tanto do TERPY quanto do SNP em traqueia de ratos com asma experimental é semelhante ao apresentado em traqueia de ratos saudáveis? 4) O efeito relaxante poderia ser potencializado em presença de agentes anti-inflamatórios e antioxidantes?

Diante desses questionamentos as hipóteses deste são: 1) Que o TERPY seria capaz de relaxar o músculo liso traqueal de ratos com asma experimental; 2) Que este relaxamento seria mais eficaz do que o SNP; 3) Que o mecanismo de relaxamento do SNP e do TERPY em traqueia de ratos com asma experimental poderia ser diferente do apresentado em traqueias saudáveis; 4) Que a utilização de agentes anti-inflamatórios e antioxidantes poderiam potencializar os efeitos do SNP e do TERPY. Assim, para testar essas hipóteses, a presente pesquisa foi delineada e desenvolvida.

O estudo do TERPY em animais com asma experimental é inédito e justificado pelo fato desse composto ter se mostrado um importante agente

vaso e broncodilatador em animais saudáveis. Parte deste estudo se propõe a caracterizar estes efeitos e comparar com o doador de NO tradicionalmente usado na clínica médica, o SNP, apontar o mecanismo de ação do novo composto em músculo liso traqueal em ratos com asma experimental e verificar o efeito do TERPY na presença de anti-inflamatórios e antioxidantes.

OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do composto doador de NO [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺ (TERPY) sobre o músculo liso traqueal de ratos com asma experimental visando caracterizar seu mecanismo de ação e compará-lo com o fármaco nitroprussiato de sódio (SNP), doador de NO padrão.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar o efeito relaxante do TERPY e SNP em músculo liso traqueal de ratos com asma experimental e saudáveis e verificar se este é dependente da concentração;
2. Avaliar a influência da via NO/GCs/GMPc no relaxamento induzido pelos doadores de NO;
3. Estudar o efeito dos canais para potássio da membrana das células do músculo liso após o bloqueio farmacológico seletivo e não seletivo;
4. Estudar a influência das fosfodiesterases (PDEs) no relaxamento induzido pelos doadores de NO;
5. Analisar a influência do TERPY e SNP sobre a contração mediada pelo influxo de Ca²⁺ via canal de cálcio operado por voltagem e por estoque;
6. Verificar o envolvimento da via das ciclooxigenases no efeito de relaxamento induzido pelos doadores de NO;
7. Verificar o envolvimento dos receptores de leucotrienos no efeito de relaxamento induzido pelos doadores de NO;
8. Estudar o efeito relaxante do TERPY e SNP em músculo liso traqueal de ratos com asma experimental na presença de agente antioxidante;
9. Observar o relaxamento bronquiolar induzido pelo TERPY.

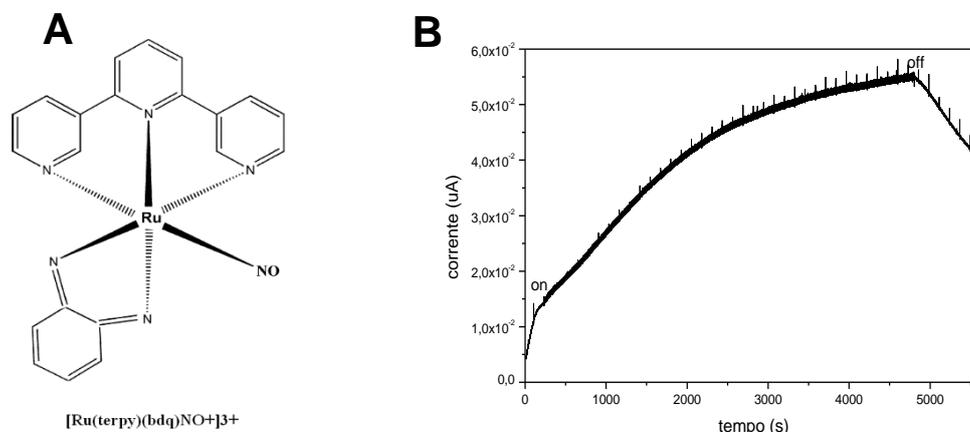
3 MÉTODOS

O doador de NO $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$, apresenta a estrutura química abaixo e as suas abreviações consistem em: terpy = terpiridina e bdq = 1,2-benzoquinona-diimina (CASTRO et al., 2011) e foi abreviado por TERPY (Fig. 3A). O TERPY apresenta massa molar de 456 g/mol e é pouco solúvel em água.

Este composto foi sintetizado e purificado pelo Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Santana da Silva e cedido ao Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Faculdade de Farmácia da UFG para realização dos testes descritos a seguir.

O cronoamperograma abaixo (Fig. 3B) foi obtido pela equipe de pesquisa responsável pela síntese usando um sensor de óxido nítrico capaz de detectar a redução do complexo $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}]^{3+}$ em pH fisiológico na concentração de 0,1 mM. Observa-se que à medida que o tempo passa, a corrente aumenta, indicando aumento da liberação do NO pelo complexo (dado cedido pelo Prof. Dr. Roberto Santana da Silva).

Figura 3- Estrutura química (A) e Cronoamperograma (B) do TERPY mostrando a liberação de NO através do aumento da corrente *versus* tempo em segundos.



Fonte: A) CASTRO et al., 2011. B) Cronoamperograma: Imagem cedida pelo Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos (180-250g) provenientes do Biotério Central da UFG. Estes protocolos foram submetidos à análise e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFG sob o protocolo 029/2013 (ANEXO 1).

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Sham e OVA. Os ratos do grupo chamado de OVA foram sensibilizados de acordo com descrito por Kanikadan et al. (2008), com algumas modificações. Os animais receberam injeção intraperitoneal da suspensão de 100 µg de ovalbumina (OVA-Sigma-Aldrich) e 10 mg de hidróxido de alumínio (Vetec) em salina (solução de NaCl 0,9% estéril) em um volume total de 1 mL no que foi estabelecido como dia 0 (zero) do experimento. No sétimo dia, foram submetidos a injeção subcutânea com 100 µg de OVA dissolvida em salina, volume total de 0,5 mL. No 14º dia de experimentos, os animais foram desafiados sendo submetidos a nebulização de OVA (1% em salina) por 25 a 30 minutos utilizando o nebulizador modelo Inalar Compact, NS, São Paulo, (0,15-0,25 mL/min) em uma caixa de contenção com as dimensões de 18,5 cm x 18,5 cm x 13,5 cm. Um dia após a nebulização, o 15º dia de experimento, os animais foram anestesiados e sacrificados por exsanguinação da artéria aorta abdominal e a traqueia foi isolada para realização dos experimentos. Estes períodos de experimentos foram escolhidos baseando-se no trabalho de Coleman et al. (1983), que demonstrou que, em ratos, os níveis de circulação de IgE aumentam entre os dias 7 e 14 após a injeção intraperitoneal de OVA.

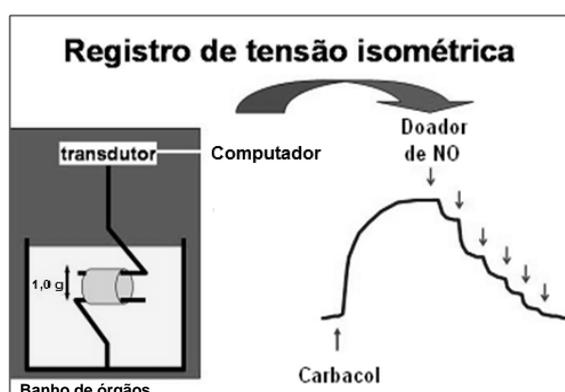
Os animais tidos como controle foram submetidos a injeção intraperitoneal e subcutânea de salina nos mesmos dias em que os animais tratados com OVA e foram chamados de “Sham”, nomenclatura corriqueira nos estudos farmacológicos para especificar animais que foram submetidos aos mesmo procedimentos que o grupo tratado, porém, sem o agente causador da doença, no caso deste trabalho, a OVA. Assim, o presente estudo apresentou dois grupos de animais, os tratados com ovoalbumina, designados de grupo OVA e o grupo dos animais saudáveis, designados de Sham.

Todos os grupos de animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*, com temperatura controlada em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro escuro de 12 horas.

3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

O tecido conjuntivo e gorduroso envolto da traqueia foi removido e o órgão foi seccionado em anéis de aproximadamente 3 mm, gerando quatro anéis no total. Estes foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixado à cuba para banho de órgão isolado (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) acoplado a um programa computadorizado (DATAQ Instruments, Akron, OH, USA) para registro da tensão isométrica como exemplificado na Fig. 4. Os anéis foram colocados em câmaras para órgãos isolados contendo solução de Krebs modificada com a seguinte composição em mM: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 1,6; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 4: Representação dos experimentos de reatividade traqueal.



Fonte: Autoria própria

Para realização dos protocolos experimentais, as preparações foram submetidas à tensão de 1 g, previamente determinada (CASTRO, 2011) por um período mínimo de 40 min para estabilização. Após o equilíbrio, as traqueias foram expostas ao agonista colinérgico carbacol ($0,5 \mu\text{M}$, EC_{50}) para se obter 50 e 100% da sua contração máxima. As traqueias foram lavadas

com solução de Krebs por no mínimo três vezes e então foi dado início aos protocolos experimentais.

3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Com o objetivo de verificar a instalação do processo inflamatório, após a realização dos experimentos em banhos de órgão, traqueias do grupo Sham e OVA foram fixadas em formaldeído 10% tamponado para confecção de lâminas histológicas. Foram realizados cortes de 10 μm com auxílio de um micrótomo e as lâminas contendo o tecido foram coradas por três métodos diferentes: hematoxilina e eosina (H&E), que permite identificar a presença de infiltrado inflamatório em que o núcleo das células fica corado de roxo; Triconômio de Masson, que permite indentificar células musculares lisas coradas em vermelho; e Azul de Toluidina, que permite indentificar mastócitos corados em púrpura.

O material corado foi avaliado em microscópio de luz Axio Scope.A1 acoplado à câmera AxioCam MRc, Carl Zeiss em aumentos de 200 e 400 vezes.

Nas lâminas coradas pelo método Azul de Toluidina, a densidade dos mastócitos em μm^2 foi calculada em toda a extensão da traqueia com o auxílio de um retículo de integração em rede (Carl Zeiss 474068000000-Netzmikrometer 12,5) que na objetiva de 40x tem-se uma área de 0,0961 μm^2 , sendo realizada uma regra de três simples para calcular-se o número de mastócitos por μm^2 . Esta técnica é chamada de morfometria.

3.4 REATIVIDADE DO MÚSCULO LISO DA TRAQUEIA

3.4.1 Efeito relaxante do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA pré-contraídos com carbacol

Para estudar o efeito relaxante do SNP e TERPY em músculo liso traqueal de ratos dos grupos Sham e OVA e verificar se este é dependente da concentração, as curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas foram realizadas em anéis das traqueias pré-contraídas com a EC_{50} do carbacol (0,5 μM) (CASTRO, 2011). Para isso, quando a resposta contrátil

atingiu o platô, foram adicionadas concentrações crescentes de SNP ou TERPY (ambos 10 nM a 100 μ M ou 10^{-8} M a 10^{-4} M) e as respostas relaxantes foram registradas.

3.4.2 Participação da via NO/GCs/GMPc sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o SNP e para o TERPY (ambos 10 nM a 100 μ M) sobre a pré-contracção induzida com carbacol (EC_{50}) em traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA na ausência ou presença (30 min) dos seguintes inibidores/bloqueadores: a) (1*H*)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-*a*)quinoxalin-1-one (ODQ), inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, (1 μ M); b) Tetraetilamônio (TEA), bloqueador não seletivo de canais para K⁺, (5 mM); c) 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), inibidor não seletivo das fosfodiesterases (PDE), (10 μ M).

3.4.3 Participação dos diferentes inibidores seletivos de fosfodiesterase (PDE) sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA

Com a finalidade de estudar o efeito relaxante do TERPY e do SNP em músculo liso traqueal de ratos dos grupos Sham e OVA em presença de diferentes inibidores de PDEs e verificar a influência destes no efeito dos doadores, as curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas foram realizadas em anéis das traqueias pré-contráidos com a EC_{50} do carbacol (0,5 μ M).

Para tanto, adicionou-se os diferentes inibidores de PDE: a) Amrinona, inibidor de PDE 3 (1 μ M); b) Rolipram, inibidor de PDE 4 (10 μ M); c) Dipyridamol, inibidor de PDE 5 (10 μ M), que ficaram incubando por 30 min. Após esse tempo, iniciou-se a resposta contrátil ao carbacol e quando ela atingiu o platô e adicionou-se concentrações crescentes do SNP ou TERPY (ambos 10 nM a 100 μ M) e as respostas relaxantes foram registradas.

3.4.4 Participação dos diferentes bloqueadores seletivos de canais para potássio sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o SNP e para o TERPY (ambos 10 nM a 100 μ M) sobre a pré-contracção induzida com carbacol (EC_{50}) em traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA na ausência ou presença (30 min) dos seguintes bloqueadores seletivos de canais para potássio: a) Cloreto de bário ($BaCl_2$, 30 μ M) bloqueador dos canais tipo retificador (K_{IR}); b) Glibenclamida (3 μ M), bloqueador dos canais dependentes de ATP (K_{ATP}); c) 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), bloqueador dos canais dependentes de voltagem (K_v); d) Clotrimazol (5 μ M) bloqueador dos canais ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}); e) Apamina, (0,5 μ M) bloqueador dos canais ativados por Ca^{2+} de baixa condutância (SK_{Ca}).

3.4.5 Participação da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA

Com a finalidade de estudar o efeito relaxante do TERPY e do SNP em músculo liso traqueal nos grupos Sham e OVA na presença do inibidor da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA) e verificar a influência destes no efeito dos doadores, as curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas foram realizadas em anéis das traqueias pré-contráidos com a EC_{50} do carbacol (0,5 μ M) na ausência ou presença (30 min) do ácido ciclopiazônico (CPA) na concentração final de 10 μ M.

3.4.6 Participação do influxo de Ca^{2+} em presença de carbacol ou KCl 75 mM

Para avaliar o influxo de Ca^{2+} estimulado pelo carbacol em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA, após estabilização, as preparações foram estimuladas com carbacol (EC_{50}) até o platô. As preparações foram novamente estimuladas com a EC_{50} do carbacol.

Entretanto, em solução de Krebs zero- Ca^{2+} até o desaparecimento da resposta contrátil, ou seja, a depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} sensíveis ao carbacol. A seguir, as traqueias foram mantidas em solução de Krebs zero- Ca^{2+} e após adição de carbacol (EC_{50}) sem resposta contrátil adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de Ca^{2+} (0 a 1,6 mM) para se obter curvas de concentração-efeito na ausência ou presença (20 min) de SNP ou TERPY, ambos à 100 μM , a concentração que produziu o relaxamento máximo (EC_{100}).

Para avaliar o influxo de Ca^{2+} estimulado por KCl (75 mM), em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA, após a estabilização, as preparações foram lavadas em solução de Krebs zero- Ca^{2+} até a completa depleção de cálcio intracelular sensível à EC_{50} do carbacol. Essa solução foi então substituída pela solução de Krebs contendo 75 mM de KCl na ausência de íons cálcio. Após estabilização, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para Ca^{2+} (0 a 1,6 mM) na ausência e na presença de SNP ou TERPY (100 μM - 20 min).

3.4.7 Participação da via das ciclooxigenases e do antagonista de leucotrienos sobre o relaxamento do SNP e TERPY em anéis de traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o SNP e para o TERPY (ambos 10 nM a 100 μM) sobre a pré-contracção induzida com carbacol (EC_{50}) em traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA na ausência ou presença (30 min) do diclofenaco de sódio, inibidor não seletivo da ciclooxigenase (10 μM) e do montelukaste, antagonista dos receptores de leucotrienos do tipo CysLT_1 (10 μM).

3.4.8 Efeito relaxante do SNP e TERPY em anéis de traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA em presença de sequestrador de ânions superóxido

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o SNP e para o TERPY (ambos 10 nM a 100 μM) sobre a pré-contracção induzida com carbacol (EC_{50}) em traqueia de ratos dos grupos Sham e OVA na ausência ou

presença (30 min) de TIRON, um sequestrador de ânions superóxido (O_2^-) (1 mM).

3.5 EFEITO DO TERPY EM CORTES DE BRONQUÍOLOS ASMÁTICOS

Este protocolo foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por Kott et al. (2002), com adaptações. Após o sacrifício, o pulmão de ratos do grupo OVA foi removido, mantido em solução de Krebs à 37°C e gaseificada, e cortado transversalmente em fatias de 1 a 2 mm com auxílio de um bisturi. Em 1 mL da solução de Krebs, os cortes foram avaliados ao microscópio de luz Axio Scope.A1 acoplado à câmera AxioCam MRc, Carl Zeiss, em aumento final de 50 vezes. Os bronquíolos foram identificados, medidos com o auxílio do software Axio Vision versão 4.7.2 de 2008 e estabeleceu-se como sendo o tempo zero do experimento. A solução de carbacol (0,5 μ M – EC₅₀) foi adicionada e 180 segundos após sua adição, a luz bronquiolar foi medida. Imediatamente após, a solução de TERPY (100 μ M – EC₁₀₀) foi adicionada e o relaxamento bronquiolar foi medido 360 segundos após o início do experimento.

Este protocolo experimental foi realizado apenas no grupo OVA e em resposta ao TERPY devido a extrema dificuldade de realização do mesmo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de tensão isométrica foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), obtidos de diferentes animais. Os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) na versão 5.01 de 2008.

As determinações da concentração que produz 50% da resposta máxima (EC₅₀) habitualmente chamada de pD₂ nos experimentos de farmacologia por ser representada matematicamente e graficamente como $-\log$ da EC₅₀ e do efeito máximo (E_{max}) foram realizadas utilizando o método de regressão não linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) na versão 5.01 de 2008.

A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi o test T Student e a análise de variância ANOVA one-way, seguido do pós-

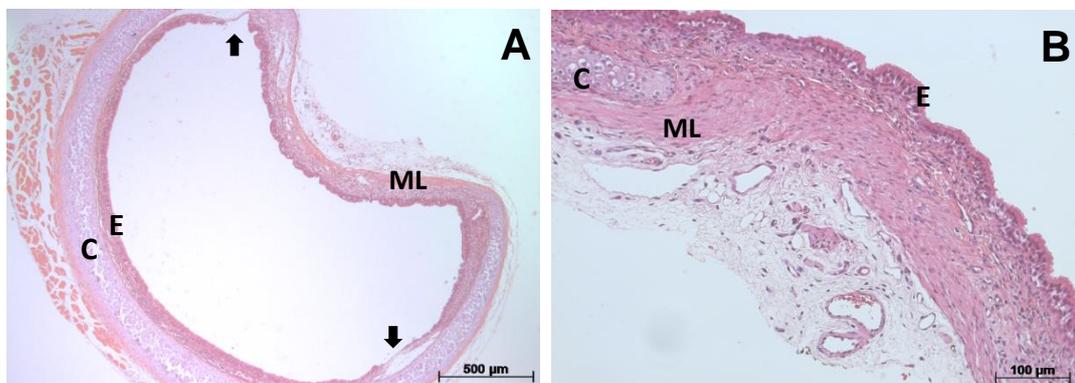
teste de Newman-Keuls pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) na versão 5.01 de 2008. Foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A Fig. 5 evidencia cortes histológicos de traqueias de rato do grupo Sham corado em H&E nos aumentos finais de 50 e 200 vezes para as Fig. 5A e 5B, respectivamente. Em ambas as imagens é possível verificar a presença de epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes (designado por E) apoiado sobre lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo. Abaixo segue cartilagem hialina (designado por C) e mais periféricamente feixes de músculo liso (designado por ML). O tecido cartilaginoso apresenta-se em forma de C (Fig. 5A), tendo suas extremidades unidas por feixes de músculo liso (Fig.5B). As duas setas da Fig. 5A indicam os locais em que o gancho de metal do banho de órgãos se fixaram durante os experimentos de reatividade.

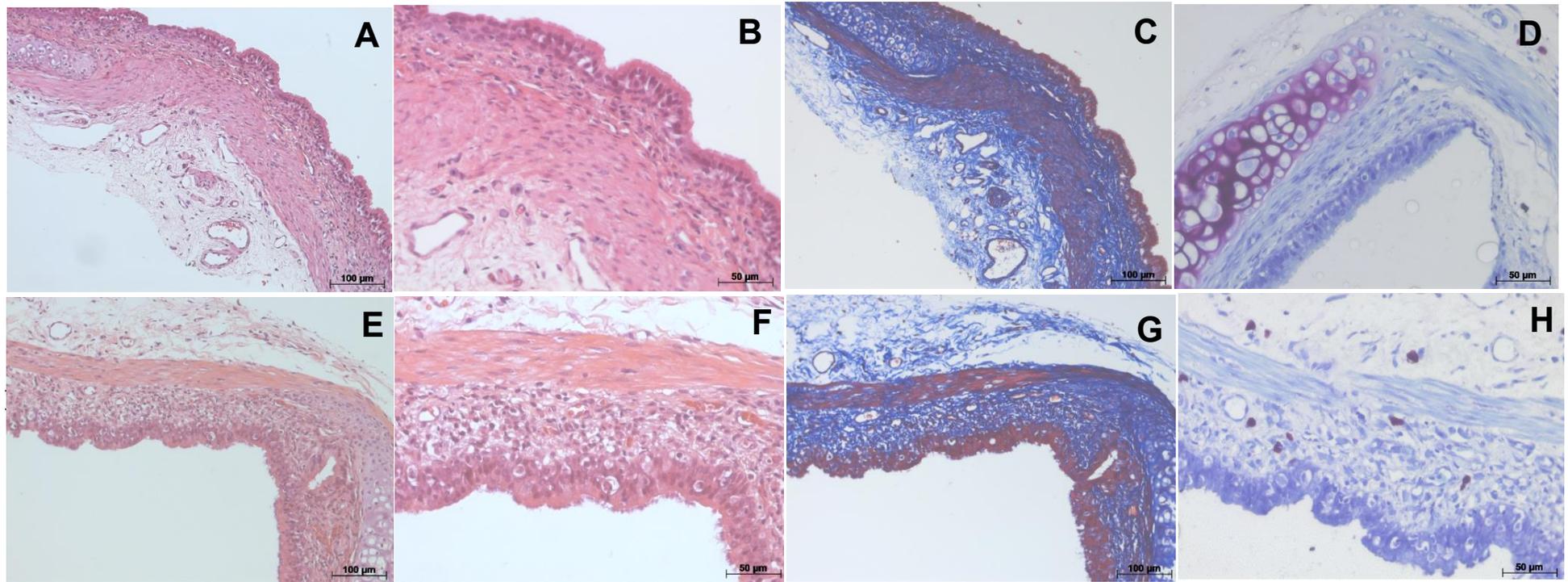
Figura 5- Fotomicroscopias de cortes histológicos transversais de traqueias de ratos Sham.



Legenda: As fotomicroscopias apresentam epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, representado por E, musculatura lisa, representado por ML, ligada a cartilagem hialina, representada por C. As setas indicam os locais de fixação dos ganchos de metal durante os experimentos de reatividade. (A) e (B) foram corados por H&E; e estão nos aumentos finais de 50x e 200x, respectivamente.

A Fig. 6 apresenta fotomicroscopias de corte histológico de traqueia de rato do grupo Sham (Fig 6A-D) e do grupo OVA (Fig. 6E-H). As imagens mostram epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, tecido conjuntivo fibroso e musculatura lisa ligada a cartilagem hialina. A Fig. 6A-D são

Figura 6- Fotomicroscopias de cortes histológicos transversais de traqueias de ratos do grupo Sham (A-D) e do grupo OVA (E-H).



Legenda: As fotomicroscopias apresentam epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, tecido conjuntivo fibroso e musculatura lisa ligada a cartilagem hialina. (A), (B), (E) e (F) foram corados por Hematoxilina e Eosina; (C) e (G) foram coradas com Triconômio de Masson e (D) e (H) foram coradas com Azul de Toluidina. Comparando (A) e (B) com (E) e (F), vê-se que estas apresentam intenso infiltrado inflamatório mononuclear subepitelial permeado por pequenos vasos sanguíneos. (C) e (G) apresentam músculo liso corado em vermelho. (D) e (H) apresentam mastócitos corados em púrpura com a densidade dessas células aumenta no grupo OVA (H) em comparação com o grupo Sham (D).

traqueias de ratos do grupo Sham e a Fig. 6E-H são do grupo OVA (ambos n=8). A Fig. 6E e 6F mostram intenso infiltrado inflamatório mononuclear subepitelial permeado de vasos sanguíneos de pequeno calibre em comparação com as Fig. 6A e 6B.

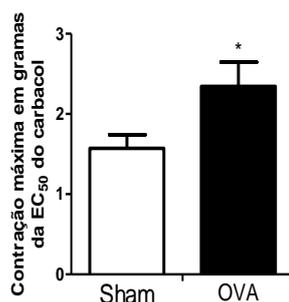
A coloração Triconômio de Masson, Fig. 6C para o grupo Sham e Fig. 6G para o grupo OVA evidenciam músculo liso corados em vermelho. Como artefato de técnica, algumas células epiteliais também podem ficar coradas em vermelho.

A coloração Azul de Toluidina, Fig. 6D para o grupo Sham e Fig. 6H para o grupo OVA evidencia mastócitos corados em púrpura. O número de mastócitos foi menor no grupo Sham em comparação com o grupo OVA. A morfometria revelou diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$), em que observou-se 44,7 mastócitos/ μm^2 no grupo Sham e 101,0 mastócitos/ μm^2 no grupo OVA. Esses achados confirmam que a ovalbumina é capaz de gerar um processo inflamatório em traqueias de ratos e as características histológicas demonstram que a asma em roedores é semelhante à asma em humanos (KUCHAREWICZ, BODZENTA-LUKASZYK e BUCZKO, 2008; MOSMANN e COFFMAN, 1989).

4.2 EFEITO CONTRÁTIL DO CARBACOL SOBRE TRAQUEIAS DE RATOS

A Fig. 7 mostra a contração expressa em gramas (g) do músculo liso traqueal dos grupos Sham e OVA em resposta à EC_{50} do carbacol (0,5 μM). No grupo Sham, a contração foi de $1,6 \pm 0,17\text{g}$, n=18 e no grupo OVA a contração foi de $2,3 \pm 0,3\text{g}$, n=15, um aumento significativo de 44% ($p < 0,05$) na reatividade. Este resultado confirma que a sensibilização com OVA produz hiperreatividade brônquica a agonistas colinérgicos semelhantes a asma humana (SOCIEDADE..., 2012).

Figura 7- Comparação entre as respostas contrateis das traqueias isoladas de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Representação das contrações em grama (g) exercida pela EC₅₀ do carbacol (0,5 uM) em média \pm EPM de traqueias de ratos do grupo Sham e do grupo OVA. Análise estatística: test t Student em que * p <0,05.

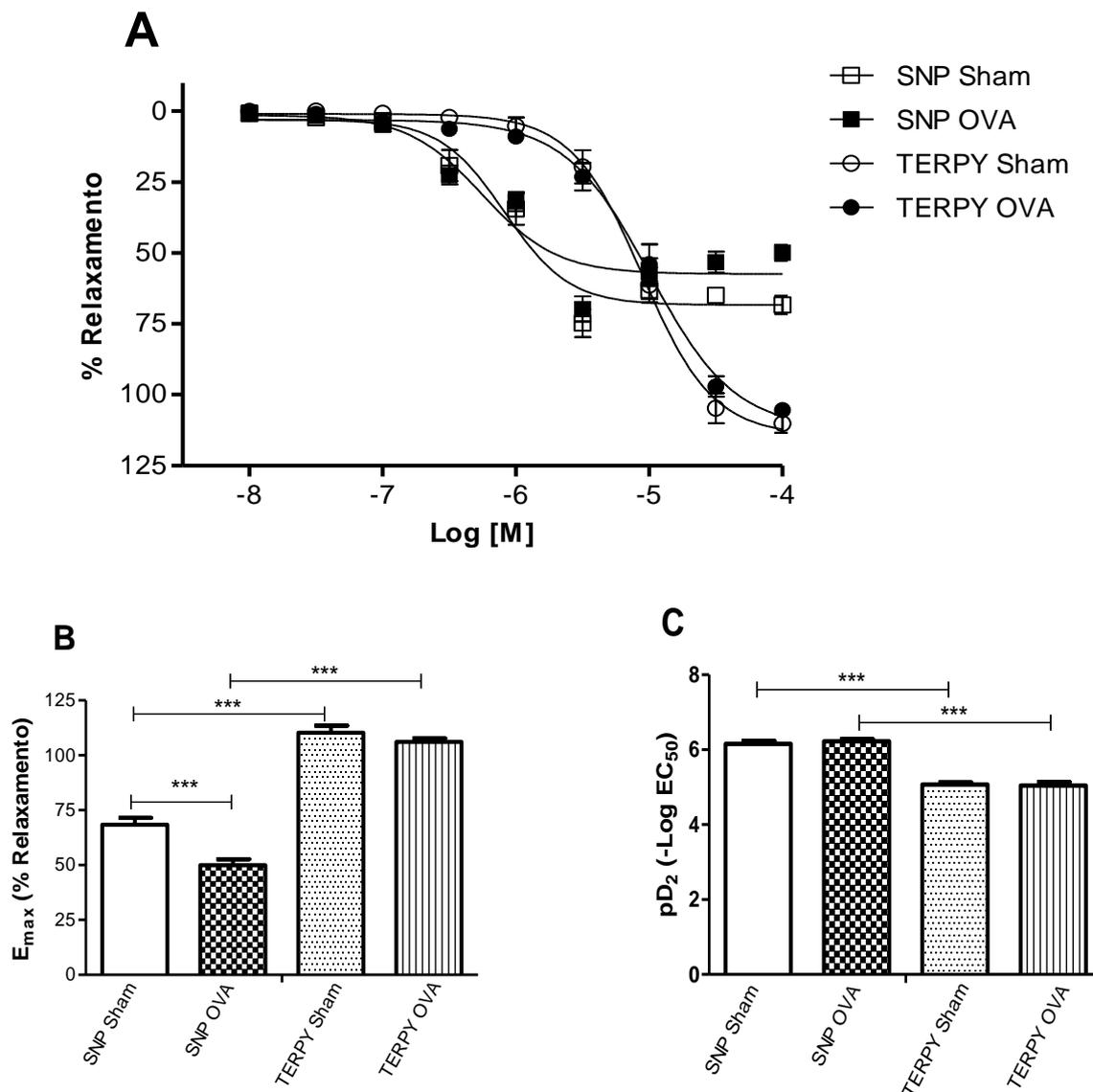
4.3 EFEITO RELAXANTE DO SNP E DO TERPY

Os doadores de NO, SNP e TERPY, induziram relaxamento em traqueias do grupo Sham e OVA pré contraídas com carbacol de forma concentração-dependente tanto em animais dos grupos Sham quanto nos OVA (Fig. 8A). O efeito máximo do SNP para o grupo Sham foi $68,3 \pm 3,1\%$, n=9 e para o grupo OVA $49,9 \pm 2,7\%$, n=6, uma redução significativa ($p < 0,001$) de 27% (Fig. 8B). Já o TERPY, não apresenta diferenças significativas de E_{max} entre o grupo Sham ($110,2 \pm 3,2\%$, n=9) e o OVA ($106,1 \pm 1,5\%$, n=9). Estes dados demonstram que o SNP é menos eficaz no relaxamento do músculo liso traqueal de animais do grupo OVA do que em músculo liso de animais Sham. Já o TERPY apresenta a mesma eficácia em ambos os grupos.

O pD_2 do SNP no grupo Sham foi de $6,1 \pm 0,07$, n=9 e no OVA $6,2 \pm 0,06$, n=6. Para o TERPY, os valores de potência foram $5,1 \pm 0,06$, n=9 para o grupo Sham e de $5,1 \pm 0,09$, n=9 para o OVA. Portanto, o estado inflamatório da traqueia não alterou a potência do SNP ou do TERPY (Fig. 8C).

Comparando o E_{max} do TERPY com o do SNP, observa-se que o TERPY é significativamente mais eficaz ($p < 0,001$) do que o SNP em provocar relaxamento do músculo liso traqueal em ambos os grupos (Fig. 8B). Entretanto, a potência do SNP é maior do que a do TERPY ($p < 0,001$) nos grupos (Fig. 8C).

Figura 8- Comparação entre o efeito relaxante do SNP e do TERPY em traqueias isoladas de ratos não sensibilizados (Sham) e sensibilizados com ovalbumina (OVA) e pré-contraídas com carbacol.



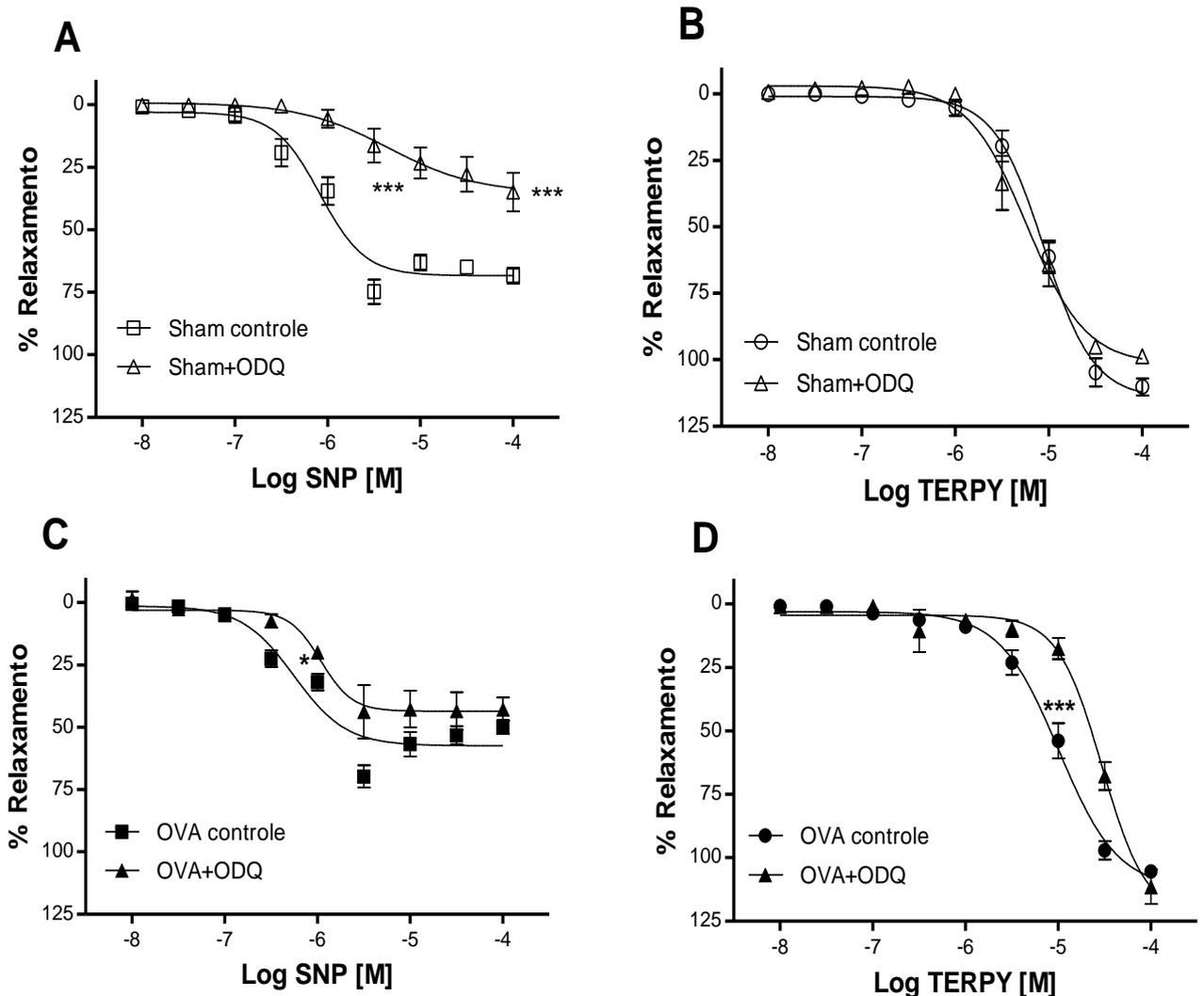
Legenda: A) Curvas concentração-efeito cumulativas para SNP e TERPY. As barras verticais representam os valores obtidos no E_{max} do relaxamento (B) e pelo pD_2 (C) provocado pelo SNP e TERPY. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Diferença estatística: *** $p < 0,001$.

4.4 EFEITO DE DIFERENTES INIBIDORES DA VIA GCs/GMPc SOBRE O RELAXAMENTO DE TRAQUEIAS DO GRUPO SHAM E OVA

4.4.1 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, ODQ

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do ODQ (1 μ M - incubado por 30 min) estão apresentados na Fig. 9A e 9B para o grupo Sham e na Fig. 9C e 9D para o grupo OVA.

Figura 9- Efeito do ODQ sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (Controle) e na presença de ODQ (1 μ M - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A presença do inibidor da GCs alterou o efeito máximo e a potência do SNP no grupo Sham (Fig. 9A). O E_{max} do SNP reduziu de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para $35,0 \pm 7,7\%$, $n=7$ na presença do ODQ. Seu pD_2 reduziu de $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para $5,2 \pm 0,22$, $n=7$. Ambos os resultados apresentaram significância de $p<0,001$ (Tab. 1).

A presença do ODQ não alterou o efeito máximo nem a potência do TERPY no grupo Sham (Fig. 9B). O E_{max} do TERPY foi de $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ para o controle e de $98,7 \pm 1,3\%$, $n=5$ na presença do ODQ. Seu pD_2 foi de $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ para o controle e de $5,2 \pm 0,10$, $n=5$ em presença de ODQ (Tab. 1).

Portanto, em animais do grupo Sham, apenas para o SNP a via da GCs parece ser importante para o relaxamento do músculo liso traqueal.

A presença do inibidor da GCs não alterou o efeito máximo do SNP ou do TERPY no grupo OVA. O E_{max} do SNP na presença do ODQ foi de $42,8 \pm 4,7\%$, $n=4$ em comparação com o controle $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ (Fig. 9C) e o E_{max} do TERPY foi $109,0 \pm 8,2\%$, $n=4$ em comparação com o controle $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ (Fig. 9D). Já os valores de pD_2 apresentaram redução significativa para os dois doadores de NO (Tab. 1). A potência do SNP reduziu de $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ para $5,9 \pm 0,04$, $n=4$ ($p<0,05$) e a do TERPY diminuiu de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ para $4,4 \pm 0,08$, $n=4$ ($p<0,001$) na presença de ODQ, evidenciando um deslocamento da curva para a direita e uma redução da potência como pode ser visto na Fig. 9D.

Assim, no grupo OVA, a inibição da GCs reduz a potência tanto do SNP quanto do TERPY.

Portanto, o processo inflamatório causado pela sensibilização e desafio com OVA altera o mecanismo de relaxamento tanto do SNP como do TERPY no músculo liso traqueal. No caso do SNP, parece que a via da GCs/GMPc teve sua participação reduzida por causa da perda da eficácia, porém, ainda com participação na potência. Para o TERPY, a via da GCs/GMPc que não participava do relaxamento no grupo Sham, apresentou importância no grupo OVA, evidenciado pela menor potência na presença do ODQ.

Tabela 1- Efeito máximo (E_{max}) e potência (pD_2) do SNP e TERPY nos grupos Sham e OVA na ausência (controle) e presença de diferentes ferramentas farmacológicas.

	SNP Sham		SNP OVA	
	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)	pD_2
Controle	68,3 ± 3,1 (n=9)	6,1 ± 0,07, n=9	49,9 ± 2,7 (n=6)	6,2 ± 0,06, n=6
ODQ	35,0 ± 7,7 (n=7)***	5,2 ± 0,22, n=7***	42,8 ± 4,7 (n=4)	5,9 ± 0,04, n=4*
IBMX	84,9 ± 3,0 (n=4)**	6,3 ± 0,04, n=4	101,9 ± 4,1 (n=4)***	6,5 ± 0,05, n=4*
Amrinona	57,0 ± 7,2 (n=5)	6,1 ± 0,13, n=5	75,0 ± 4,7% (n=3)***	6,5 ± 0,09, n=3
Rolipram	90,1 ± 6,9 (n=3)**	6,5 ± 0,10, n=3*	98,1 ± 2,7 (n=3)***	6,4 ± 0,19, n=3
Dipiridamol	84,0 ± 7,2 (n=4)*	6,0 ± 0,06, n=4	89,9 ± 3,0 (n=3)***	6,6 ± 0,11, n=3*

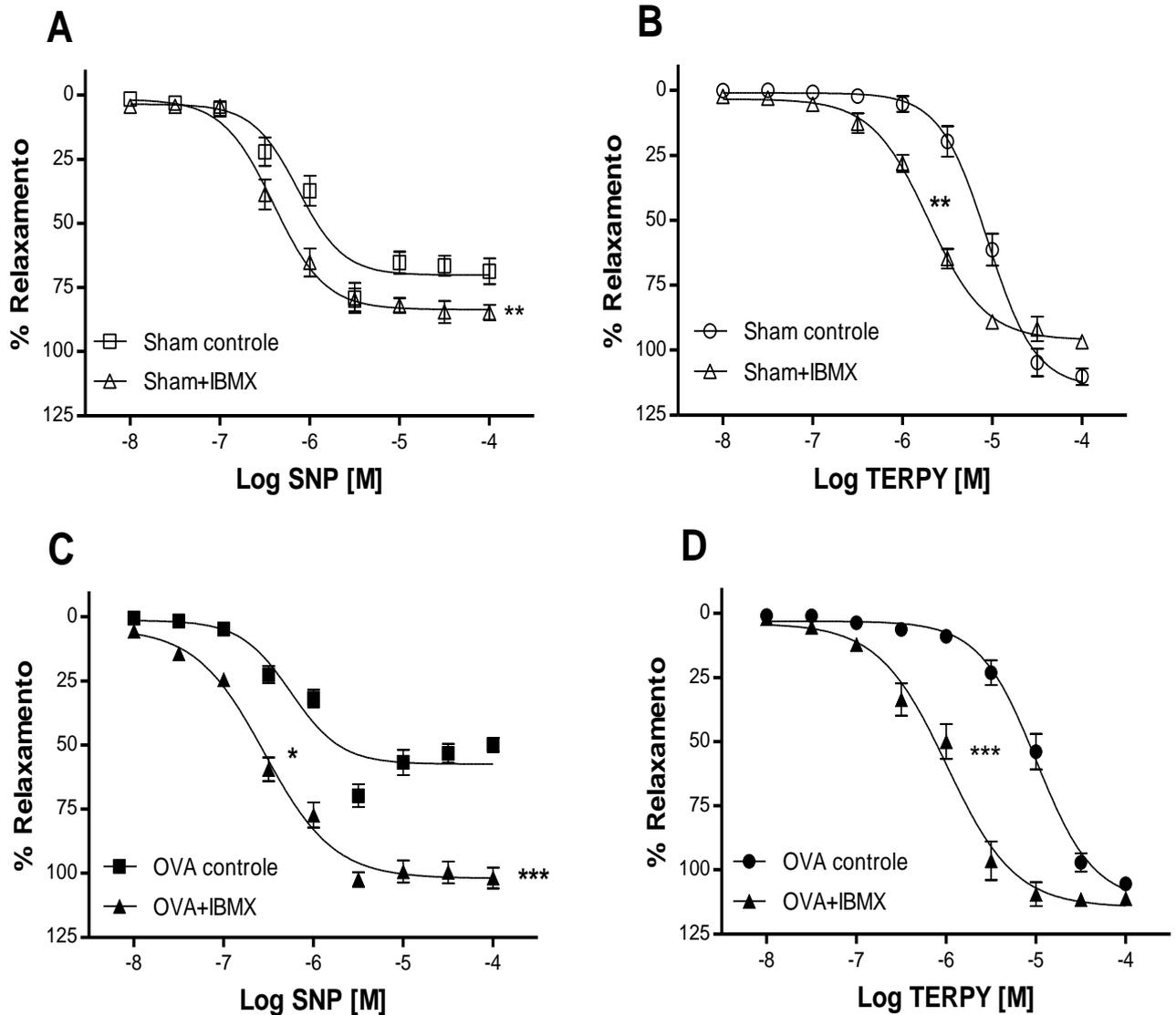
	TERPY Sham		TERPY OVA	
	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)	pD_2
Controle	110,2 ± 3,2 (n=9)	5,1 ± 0,06, n=9	106,1 ± 1,5 (n=9)	5,0 ± 0,09, n=9
ODQ	98,7 ± 1,3 (n=5)	5,2 ± 0,10, n=5	109,0 ± 8,2 (n=4)	4,4 ± 0,08, n=4 ***
IBMX	96,8 ± 1,5 (n=5)	5,5 ± 0,19, n=5**	111,2 ± 2,1 (n=4)	6,0 ± 0,13, n=4***
Amrinona	101,1 ± 2,6 (n=4)	5,0 ± 0,23, n=4	102,8 ± 2,6 (n=3)	5,2 ± 0,13, n=3
Rolipram	107,9 ± 3,4 (n=4)	5,6 ± 0,06, n=4***	105,5 ± 2,0 (n=3)	5,3 ± 0,12, n=3
Dipiridamol	108,5 ± 2,8 (n=4)	5,2 ± 0,10, n=4	107,5 ± 2,7 (n=3)	5,2 ± 0,13, n=3

Legenda: Os pontos representam médias ± EPM expressos em porcentagem. Significância estatística comparando as diferentes ferramentas farmacológicas com o controle de cada grupo, em que *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001.

4.4.2 Efeito do inibidor não seletivo de fosfodiesterases, IBMX

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do inibidor não seletivo de fosfodiesterase (PDE) - IBMX (10 μ M - incubado por 30 min) estão apresentados na Fig. 10A e 10B para o grupo Sham e na Fig. 10C e 10D para o grupo OVA.

Figura 10- Efeito do IBMX sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (Controle) e na presença de IBMX (10 μ M - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001.

O IBMX aumentou o efeito máximo do SNP no grupo Sham (Fig. 10A), seu E_{max} aumentou de $68,3 \pm 3,1\%$, n=9 para $84,9 \pm 3,0\%$, n=4, um aumento significativo de 24% (p<0,01 – Tab. 1). Já para o TERPY, o IBMX não alterou E_{max} (controle: $110,2 \pm 3,2\%$, n=9 versus $96,8 \pm 1,5\%$, n=5).

A potência mostrou-se alterada apenas para o TERPY em presença do inibidor não seletivo de PDE no grupo Sham. O pD_2 do TERPY foi de $5,1 \pm$

0,06, n=9 para o controle e de $5,5 \pm 0,19$, n=5 em presença de IBMX, evidenciando um aumento da potência ($p < 0,01$ -Tab. 1) representado graficamente pelo deslocamento da curva para a esquerda (Fig. 10B). O pD_2 do SNP mostrou-se inalterado em presença de IBMX ($6,3 \pm 0,04$, n=4) em comparação com o controle ($6,1 \pm 0,07$, n=9).

Estes dados sugerem que, no grupo Sham, a inibição das PDEs pode melhorar o perfil de relaxamento do músculo liso traqueal provocado pelo SNP e pelo TERPY.

A inibição não seletiva das PDEs pelo IBMX modificou os parâmetros de eficácia e potência do SNP no grupo OVA. O E_{max} do SNP, que era $49,9 \pm 2,7\%$, n=6, aumentou para $101,9 \pm 4,1\%$, n=4 (Fig. 10C), um aumento significativo de 104% ($p < 0,001$ – Tab. 1). O pD_2 aumentou de $6,2 \pm 0,06$, n=6 para $6,5 \pm 0,05$, n=4 ($p < 0,05$ – Tab. 1).

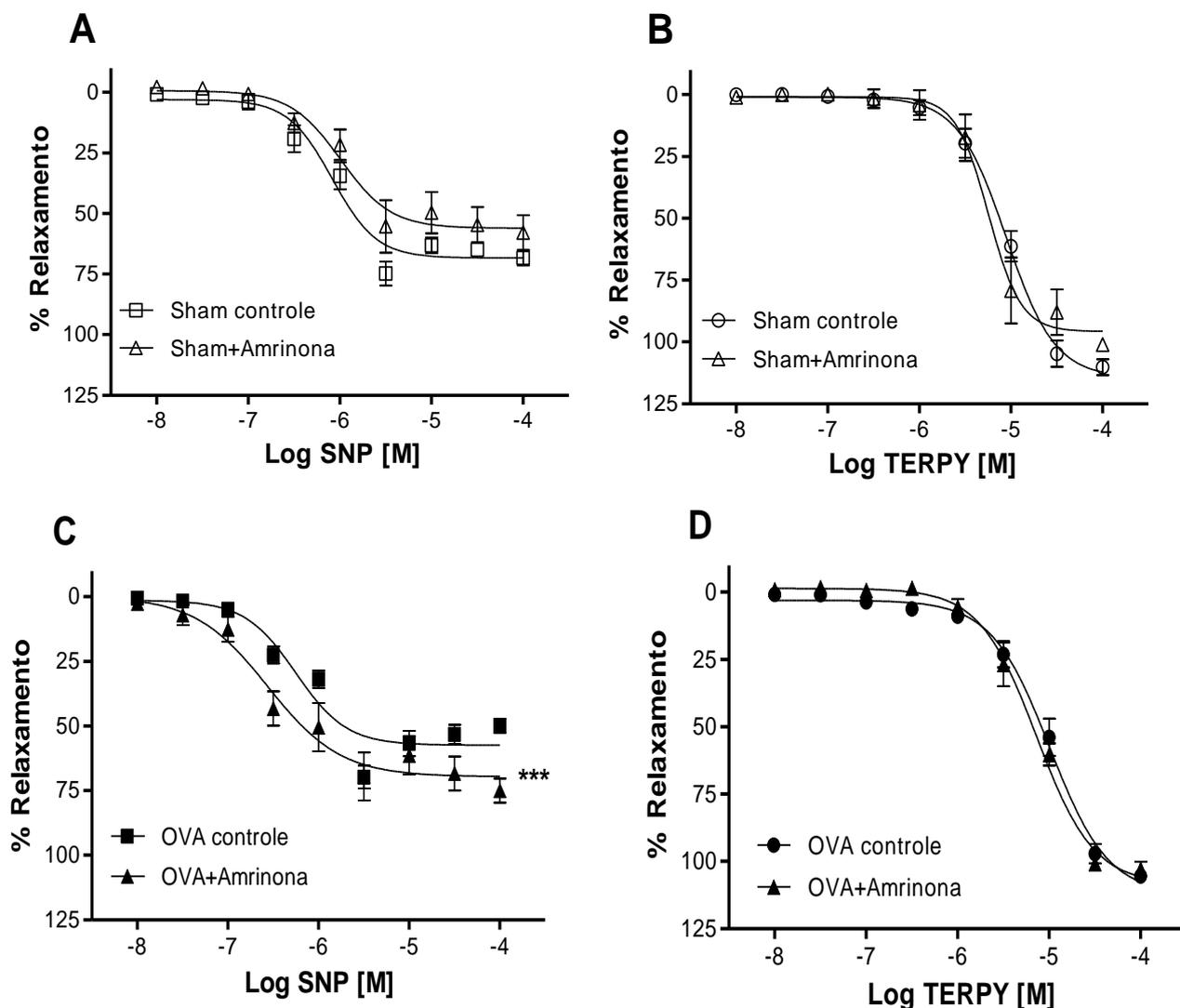
Para o relaxamento produzido pelo TERPY no grupo OVA, assim como no grupo Sham, o IBMX alterou sua potência, sem interferir no efeito máximo (Fig 10D). O pD_2 aumentou de $5,0 \pm 0,09$, n=9 para $6,0 \pm 0,13$, n=4 ($p < 0,001$ -Tab. 1), um deslocamento da curva para a esquerda mais intenso do que em animais Sham. O E_{max} para o controle foi de $106,1 \pm 1,5\%$, n=9 e em presença do IBMX foi de $111,2 \pm 2,1\%$, n=4 no grupo OVA.

Os resultados com IBMX sugerem que os nucleotídeos cíclicos clivados pelas PDEs têm importância para o relaxamento do SNP e do TERPY em músculo liso traqueal do grupo Sham (ratos saudáveis) e do grupo OVA (ratos com asma experimental). Entretanto, a maior disponibilidade destes nucleotídeos parecem ter efeitos mais importantes para relaxar o músculo liso inflamado, tanto para o SNP quanto para o TERPY.

4.4.3 Efeito do inibidor seletivo de fosfodiesterase 3, amrinona

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do inibidor seletivo de PDE 3 amrinona ($0,1 \mu M$ - incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 11A e 11B para o grupo Sham e na Fig. 11C e 11D para o grupo OVA.

Figura 11- Efeito da amrinona sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (Controle) e na presença de amrinona (0,1 μ M - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A amrinona não alterou significativamente a potencia e eficácia seja do SNP como do TERPY no grupo Sham (Tab. 1). Para o SNP (Fig. 11A), o E_{max} da curva controle foi $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ e em presença de amrinona $57,0 \pm 7,2\%$, $n=5$. O pD_2 presentou-se $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para o controle e $6,1 \pm 0,13$, $n=5$ em presença de amrinona. Para o TERPY (Fig. 11B), o E_{max} da curva controle foi $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ e em presença da amrinona $101,1 \pm 2,6\%$, $n=4$.

O pD_2 controle do TERPY apresentou valores de $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ e em presença de amrinona $5,0 \pm 0,23$, $n=4$.

Parece que a inibição da PDE 3 em músculo liso traqueal do grupo Sham não interfere no mecanismo de relaxamento de ambos os doadores de NO.

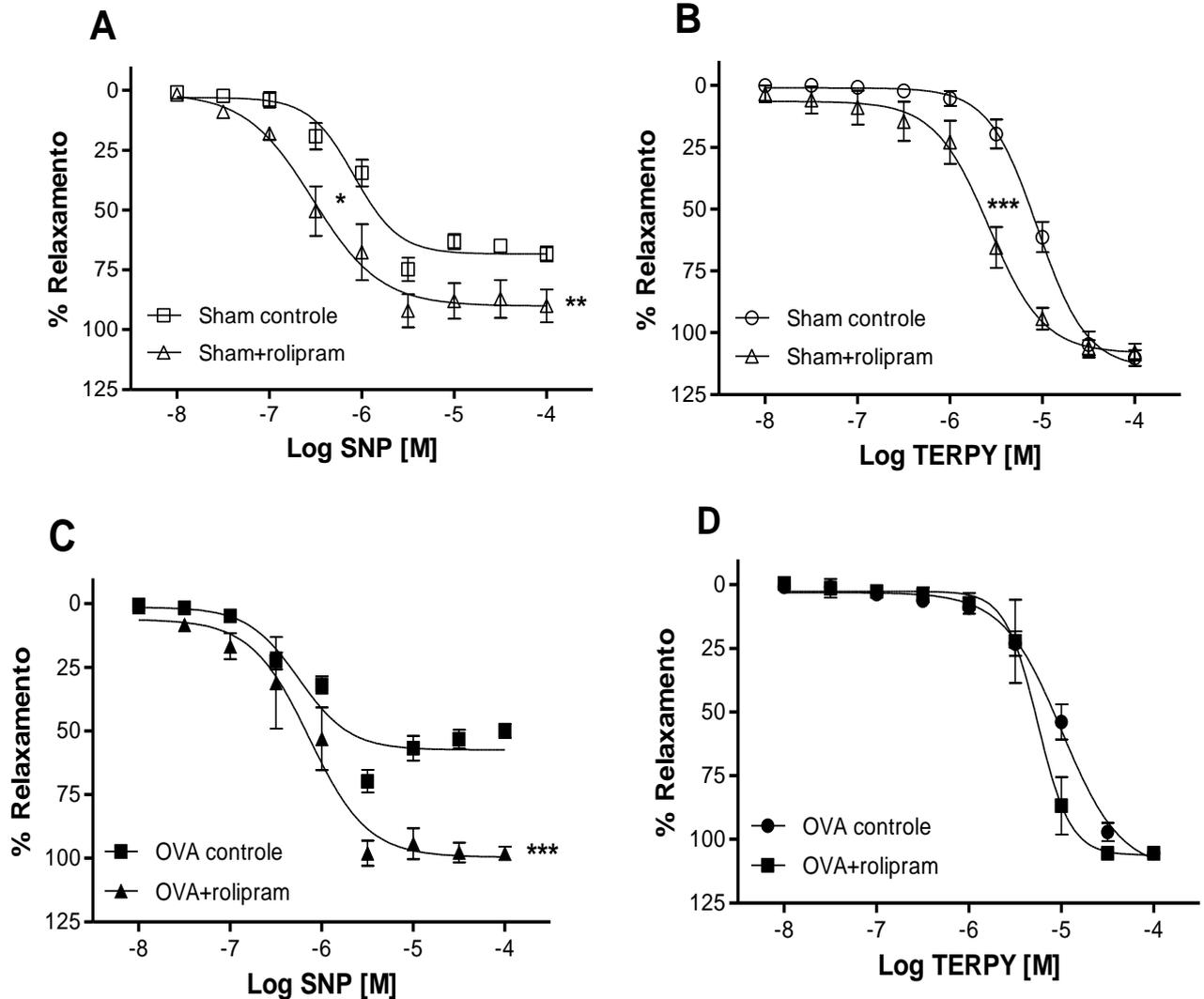
Para o grupo OVA, o E_{max} da curva controle para o SNP foi $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ e em presença de amrinona foi $75,0 \pm 4,7\%$, $n=3$ (Fig. 11C), um aumento significativo de 50% de eficácia, indicando que a inibição de PDE 3 pode favorecer o efeito do SNP. O pD_2 apresentou-se $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ para o controle e $6,5 \pm 0,09$, $n=3$ em presença de amrinona. Para o TERPY (Fig. 11D), o E_{max} da curva controle foi $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e em presença da amrinona $102,8 \pm 2,6\%$, $n=3$. O pD_2 do controle apresentou-se em $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ e em presença de amrinona $5,2 \pm 0,13$, $n=3$.

Esses resultados demonstraram que a inibição da PDE 3 em músculo liso traqueal do grupo Sham não interferiu no mecanismo de relaxamento do TERPY. Entretanto, sua inibição pode ser importante para o relaxamento promovido pelo SNP em traqueia do grupo OVA.

4.4.4 Efeito do inibidor seletivo de fosfodiesterase 4, rolipram

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do inibidor seletivo de PDE 4 rolipram ($10 \mu M$ - incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 12A e 12B para o grupo Sham e na Fig. 12C e 12D para o grupo OVA.

Figura 12- Efeito do rolipram sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (Controle) e na presença de rolipram (10 μ M - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O rolipram, inibidor de PDE 4, levou à modificação da eficácia e da potência do SNP no grupo Sham (Fig.12A). O E_{max} do SNP aumentou de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para $90,1 \pm 6,9\%$, $n=3$, um aumento de 32% ($p < 0,01$ -Tab 1). O pD_2 do SNP aumentou de $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para $6,5 \pm 0,10$, $n=3$ em presença de rolipram ($p < 0,05$ -Tab. 1).

No grupo Sham, o TERPY teve alteração de sua potência na presença do rolipram (Fig. 12B). Seu pD_2 aumentou de $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ para $5,6 \pm 0,06$, $n=4$, um aumento de 10% na potência ($p<0,001$ -Tab. 1), evidenciado pelo desvio da curva para a esquerda. O E_{max} da curva controle foi $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ e em presença do rolipram $107,9 \pm 3,4\%$, $n=4$.

Esses resultados sugerem que a inibição da PDE 4 em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham melhora o efeito relaxante tanto do SNP quanto do TERPY.

No grupo OVA, o inibidor de PDE 4 levou à modificação da eficácia do SNP (Fig. 12C). O E_{max} do SNP aumentou de $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ para $98,1 \pm 2,7\%$, $n=3$, um aumento de 97% ($p<0,001$ -Tab. 1). O pD_2 do SNP apresentou-se $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ para o controle e $6,4 \pm 0,19$, $n=3$ em presença de rolipram.

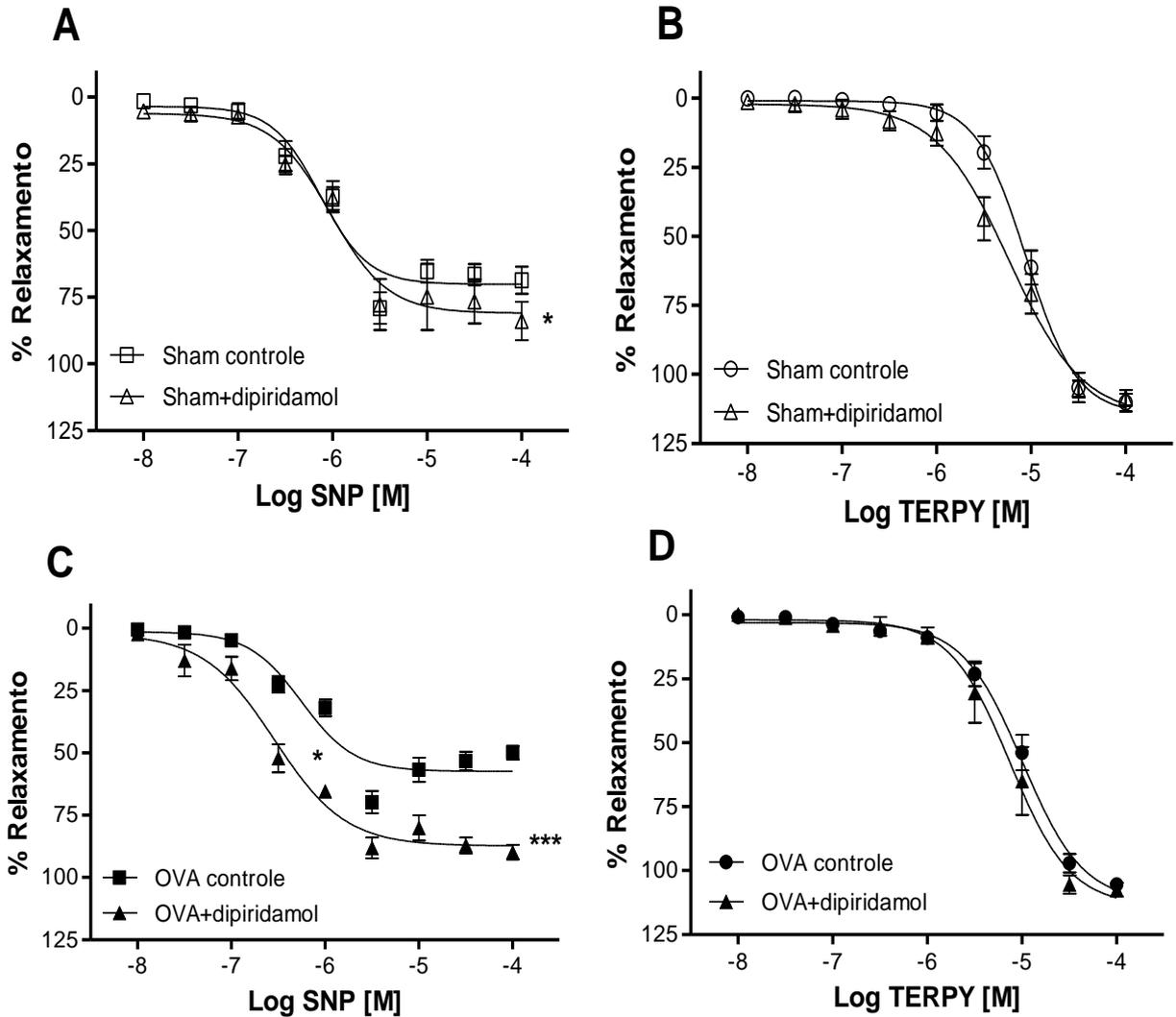
No grupo OVA, o TERPY apresentou E_{max} de $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e em presença de rolipram $105,5 \pm 2,0\%$, $n=3$. O pD_2 para o controle foi $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ e em presença do inibidor seletivo $5,3 \pm 0,12$, $n=3$, mostrando ausência de alteração de pD_2 na presença do rolipram (Fig. 12D).

Esses resultados indicam que a inibição da PDE 4 em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham melhora o efeito relaxante do SNP.

4.4.5 Efeito do inibidor seletivo de fosfodiesterase 5, dipiridamol

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do inibidor seletivo de PDE 5, dipiridamol ($10 \mu M$ - incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 13A e 13B para o grupo Sham e na Fig. 13C e 13D para o grupo OVA.

Figura 13- Efeito do dipiridamol sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (Controle) e na presença de dipiridamol (10 μ M - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Na presença de dipiridamol, o único parâmetro farmacológico alterado foi a eficácia do SNP que se mostrou aumentado (Fig. 13A). Seu E_{max} aumentou de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para $84,0 \pm 7,2\%$, $n=4$, um aumento de 23% ($p < 0,05$ - Tab. 1). O pD₂ do SNP apresentou-se $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para o controle e $6,0 \pm 0,06$, $n=4$ em presença do dipiridamol.

Para o grupo Sham, o E_{max} da curva controle do TERPY (Fig. 13B) foi $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ e em presença do dipiridamol $108,5 \pm 2,8\%$, $n=4$. O pD_2 controle do TERPY apresentou-se $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ e em presença do inibidor de PDE 5 valores de $5,2 \pm 0,10$, $n=4$.

A inibição da PDE 5 alterou apenas os parâmetros farmacológicos avaliados do SNP no grupo OVA (Fig. 13C), demonstrando que a inibição desta PDE pode melhorar o efeito do SNP em músculo liso traqueal inflamado. O E_{max} do SNP reduziu de $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ para $89,9 \pm 3,0\%$, $n=3$, um aumento de 80% na eficácia ($p<0,001$ -Tab. 1). O pD_2 do SNP aumentou de $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ na curva controle para $6,6 \pm 0,11$, $n=3$ em presença de dipiridamol ($p<0,05$ - Tab. 1).

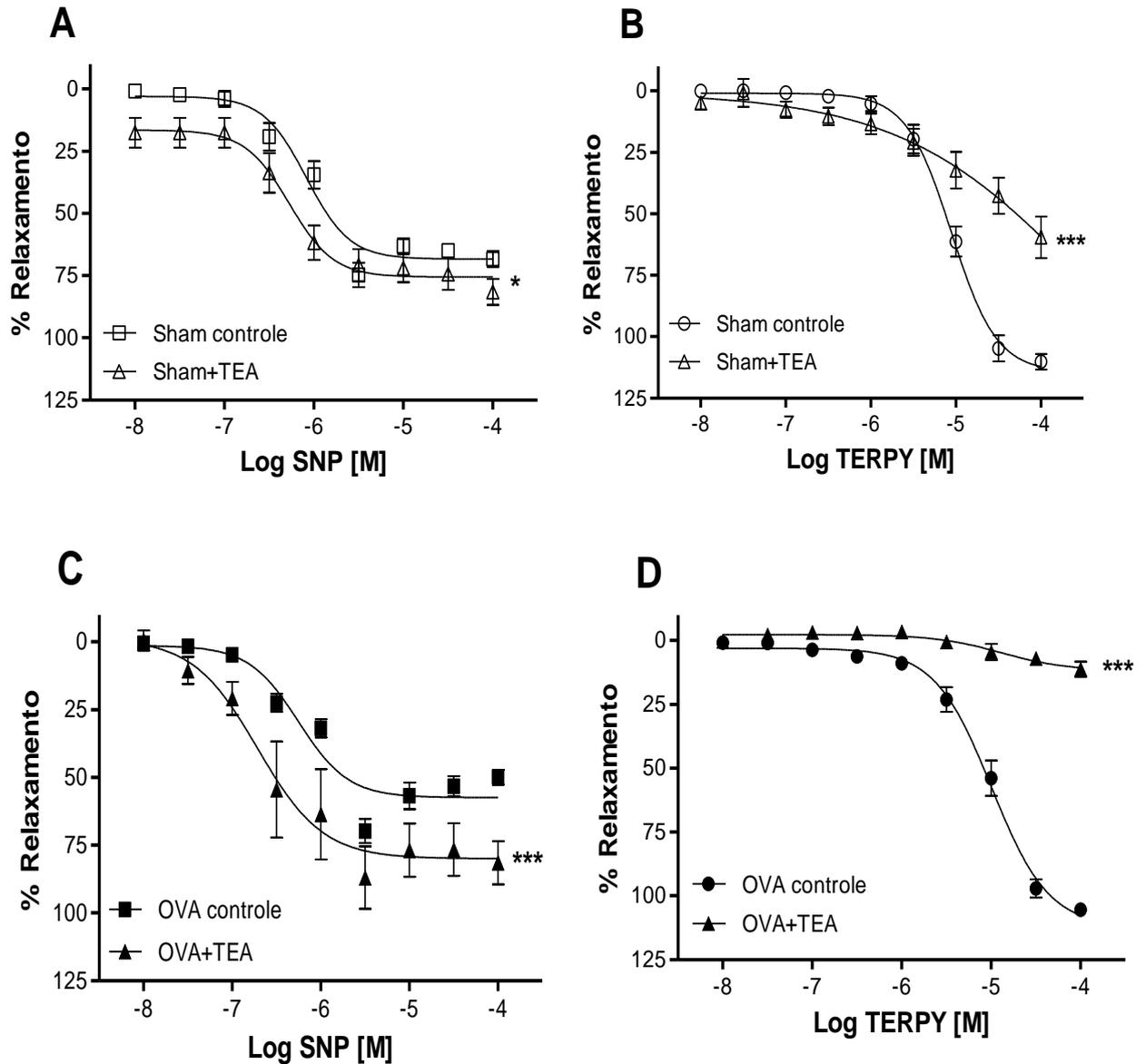
No grupo OVA, o E_{max} do TERPY (Fig. 13D) foi $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e em presença do dipiridamol $107,5 \pm 2,7\%$, $n=3$. O pD_2 controle do TERPY apresentou valores de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ e em presença do inibidor de PDE 5 valores de $5,2 \pm 0,13$, $n=3$.

4.5 EFEITO DE DIFERENTES BLOQUEADORES DE CANAIS PARA POTÁSSIO SOBRE O RELAXAMENTO DE TRAQUEIAS DO GRUPO SHAM E OVA

4.5.1 Efeito do bloqueador não seletivo dos canais de potássio, tetraetilamônio (TEA)

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do bloqueador não seletivo de canais para potássio, tetraetilamônio – TEA (5 mM- incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 14A e 14B para o grupo Sham e na Fig. 14C e 14D para o grupo OVA.

Figura 14- Efeito do TEA sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (Controle) e na presença de TEA (5 mM - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μM) em ambos os grupos. Os pontos representam médias ± EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001.

O bloqueador não seletivo dos canais para potássio tetraetilamônio (TEA) alterou o efeito máximo tanto do SNP (Fig. 14A) quanto do TERPY (Fig. 14B) no grupo Sham. O E_{max} do SNP aumentou de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para $81,6 \pm 5,2\%$, $n=9$, um aumento significativo de 19% ($p < 0,05$ – Tab. 2). Entretanto,

o TERPY apresentou uma redução de 56% de seu E_{max} ($p < 0,001$ -Tab. 2), variando de $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ para $48,3 \pm 2,7\%$, $n=7$.

Ambos os doadores de NO não tiveram sua potência alterada estatisticamente pela presença do TEA no grupo Sham. Na ausência do bloqueador, o pD_2 do SNP foi de $6,1 \pm 0,07$, $n=9$, e na presença $6,3 \pm 0,09$, $n=9$. Para o TERPY, o pD_2 foi de $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ na ausência do TEA e na presença $4,9 \pm 0,18$, $n=7$ (Tab. 2).

Esses resultados evidenciam a participação dos canais para potássio no relaxamento do músculo liso traqueal provocado pelo SNP e pelo TERPY.

Assim como no grupo Sham, o TEA alterou o efeito máximo tanto do SNP (Fig. 14C) quanto do TERPY (Fig. 14D), porém, não modificou suas respectivas potências em traqueias de ratos do grupo OVA. O E_{max} do SNP variou de $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ para $81,5 \pm 7,9\%$, $n=5$, o mesmo aumento de 19% ($p < 0,05$ – Tab. 2) observado no grupo Sham. Entretanto, a redução do E_{max} para o TERPY na presença do TEA no grupo OVA foi maior do que a observada no grupo Sham, uma redução de efeito máximo de 87% em comparação com o controle. Em valores, o E_{max} para o TERPY na ausência do TEA foi de $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e na presença do bloqueador foi de $14,0 \pm 1,7\%$, $n=3$ ($p < 0,001$ -Tab. 2). Em relação à potência, obtiveram-se os seguintes valores: para o SNP na ausência de TEA $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ e na presença $6,2 \pm 0,26$, $n=9$. Para o TERPY, o pD_2 foi de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ na ausência do TEA e na presença $4,9 \pm 0,30$, $n=3$ (Tab. 2).

Conforme demonstram os resultados, os canais para potássio participam do mecanismo de relaxamento do músculo liso traqueal para os doadores de NO, SNP e TERPY, e a participação desses canais independem do estado inflamatório do órgão.

Tabela 2- Efeito máximo (E_{max}) e potência (pD_2) do SNP e TERPY nos grupos Sham e OVA na ausência (controle) e presença de diferentes ferramentas farmacológicas

	SNP Sham		SNP OVA	
	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)	pD_2
Controle	68,3 ± 3,1% (n=9)	6,1 ± 0,07, n=9	49,9 ± 2,7 (n=6)	6,2 ± 0,06, n=6
TEA	81,6 ± 5,2 (n=9)*	6,3 ± 0,09, n=9	81,5 ± 7,9 (n=5)***	6,2 ± 0,26, n=5
4-AP	96,2 ± 2,1 (n=5)***	6,4 ± 0,07, n=5*	99,9 ± 5,4 (n=5)***	6,7 ± 0,08, n=5***
Apamina	34,2 ± 7,5 (n=4)***	5,7 ± 0,73, n=4	76,4 ± 7,8 (n=4)***	6,3 ± 0,09, n=4
Bário	43,7 ± 5,1 (n=4)***	4,6 ± 0,03, n=4***	57,5 ± 4,8 (n=4)	6,3 ± 0,05, n=4
Clotrimazol	69,9 ± 3,8 (n=3)	6,2 ± 0,12, n=3	102,1 ± 5,6 (n=4)***	6,5 ± 0,19, n=4
Glibenclamida	58,7 ± 7,7 (n=4)	6,3 ± 0,07, n=4	46,1 ± 3,6 (n=6)	6,2 ± 0,09, n=6
CPA	38,9 ± 6,6%, (n=4)***	5,8 ± 0,07, n=4**	62,1 ± 4,8 (n=4)	5,8 ± 0,22, n=4

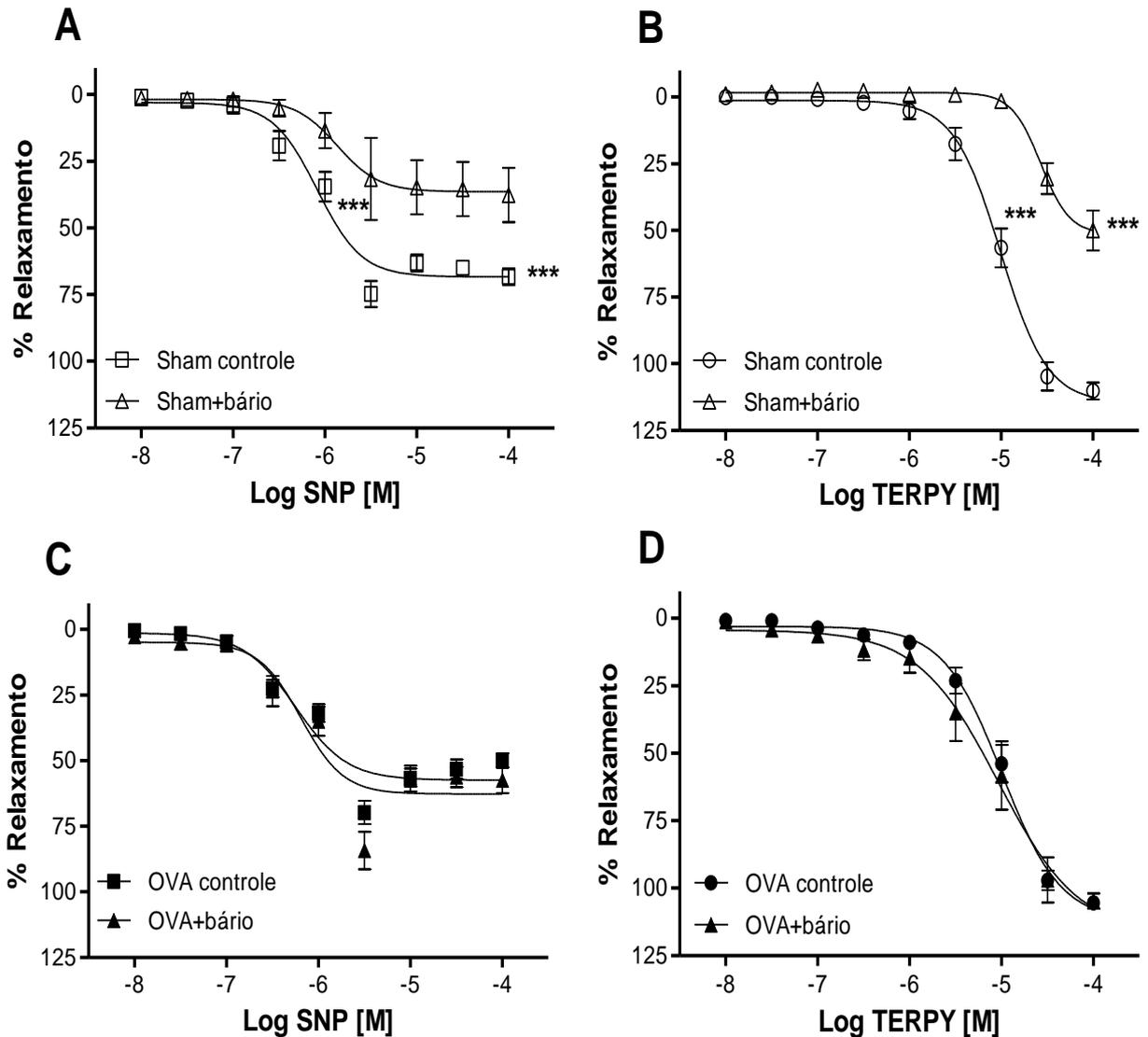
	TERPY Sham		TERPY OVA	
	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)	pD_2
Controle	110,2 ± 3,2 (n=9)	5,1 ± 0,06, n=9	106,1 ± 1,5% (n=9)	5,0 ± 0,09, n=9
TEA	48,3 ± 2,7 (n=7)***	4,9 ± 0,18, n= 7	14,0 ± 1,7 (n=4)***	4,9 ± 0,30, n=3
4-AP	88,2 ± 2,4 (n=4)***	4,4 ± 0,12, n=4***	109,5 ± 1,8 (n=5)	5,2 ± 0,22, n=5
Apamina	99,3 ± 1,5%, (n=4)	5,0 ± 0,11, n=4	105,6 ± 1,6 (n=6)	5,2 ± 0,14, n=6
Bário	23,6 ± 6,8 (n=4)***	6,2 ± 0,12, n=4***	104,8 ± 2,8 (n=5)	5,1 ± 0,16, n=5
Clotrimazol	98,7 ± 2,4 (n=4)*	5,2 ± 0,34, n=4	108,6 ± 6,2 (n=3)	4,7 ± 0,89, n=3
Glibenclamida	77,5 ± 5,1 (n=3)***	4,7 ± 0,05, n=3**	108,2 ± 3,1 (n=7)	4,9 ± 0,17, n=6
CPA	96,9 ± 3,0 (n=3)	4,9 ± 0,04, n= 3	114,2 ± 1,5 (n=4)	3,9 ± 0,21, n= 4***

Legenda: Os pontos representam médias ± EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Significância estatística comparando as diferentes ferramentas farmacológicas com o controle de cada grupo, em que *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001.

4.5.2 Efeito do bloqueador dos canais para K^+ tipo retificador (K_{IR}), $BaCl_2$

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do bloqueador seletivo de canais para potássio do tipo retificadores (K_{IR}), bário (30 μ M- incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 15A e 15B para o grupo Sham e na Fig. 15C e 15D para o grupo OVA.

Figura 15- Efeito do BaCl₂ sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (Controle) e na presença de bário (30 μ M - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A presença do bário levou à alteração significativa ($p < 0,001$ – Tab. 2) para o efeito máximo e para a potência tanto do SNP (Fig. 15A) quanto do TERPY (Fig. 15B), evidenciando que o canal K_{IR} é importante para o relaxamento do músculo liso traqueal do grupo Sham.

Como pode ser observado na tabela 2, no grupo Sham, o E_{max} do SNP variou de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para $43,7 \pm 5,1\%$, $n=4$, uma redução de 36% na

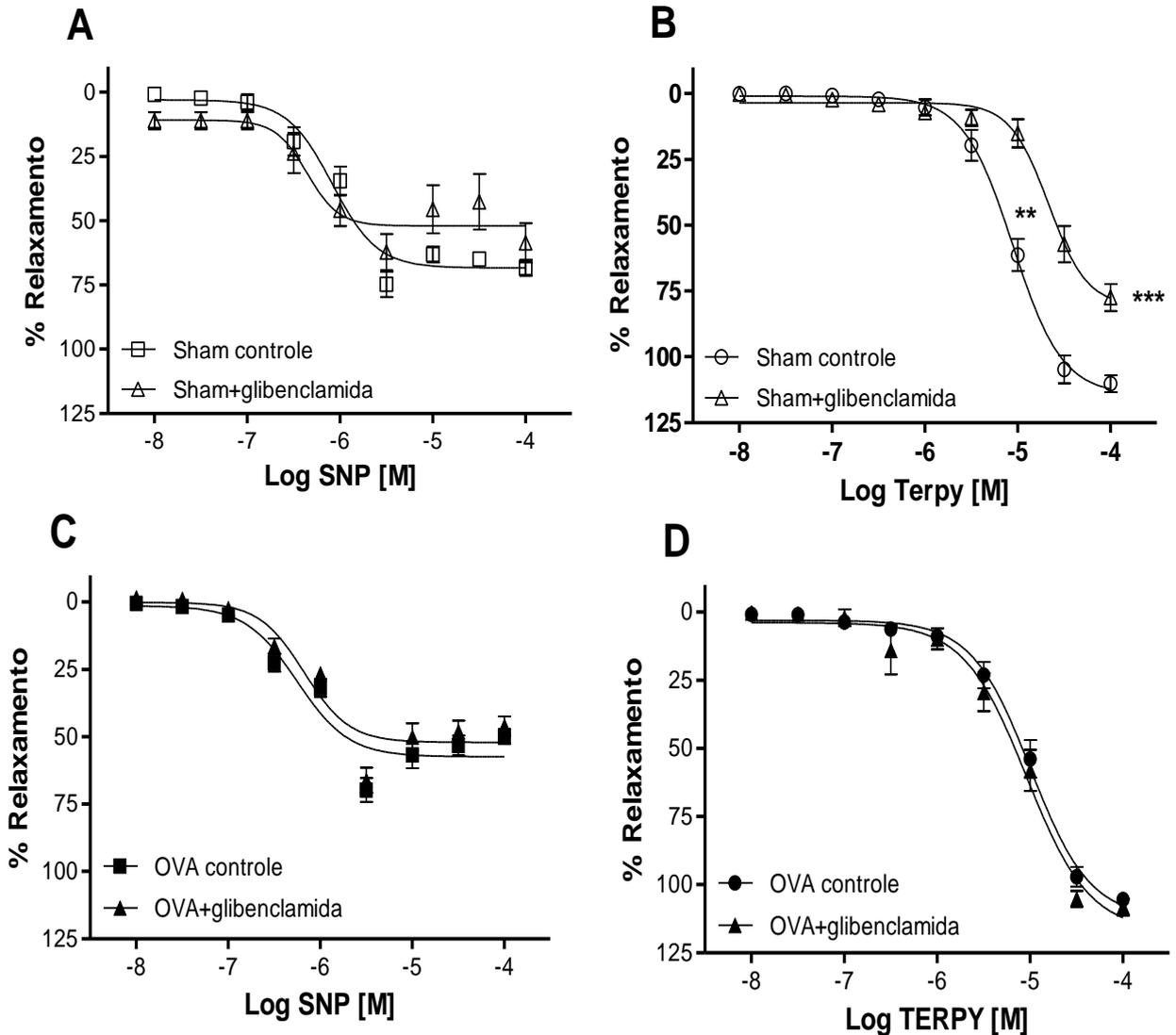
eficácia e seu pD_2 reduziu de $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para $4,6 \pm 0,03$, $n=4$ ($p<0,001$). Para o TERPY, o E_{max} reduziu de $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ para $23,6 \pm 6,8\%$, $n=4$, uma redução de 79% na eficácia e o pD_2 aumentou de $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ para $6,2 \pm 0,12$, $n=4$ ($p<0,001$).

Diferentemente do observado para o grupo Sham, o efeito máximo e a potência tanto do SNP (Fig. 15C) quanto do TERPY (Fig. 15D), não sofreram alterações em presença de bário no grupo OVA, sugerido que o processo inflamatório pode dessensibilizar o canal K_{IR} . O E_{max} da curva controle do SNP foi $49,9 \pm 2,7\%$, $n=9$ e na presença de bário $57,5 \pm 4,8\%$, $n=4$. O pD_2 no controle foi $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ e na presença do bário foi $6,3 \pm 0,05$, $n=4$. Para o TERPY, o E_{max} da curva controle foi $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e em presença de bário foi $104,8 \pm 2,8\%$, $n=5$. O pD_2 no controle do TERPY apresentou valores de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ e para o bário $5,1 \pm 0,16$, $n=5$.

4.5.3 Efeito do bloqueador dos canais para K^+ dependentes de ATP (K_{ATP}), glibenclamida

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do bloqueador seletivo de canais para potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), glibenclamida ($3 \mu M$ - incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 16A e 16B para o grupo Sham e na Fig. 16C e 16D para o grupo OVA.

Figura 16- Efeito da glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (controle) e na presença de glibenclamida (3 μ M - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O bloqueador seletivo dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), glibenclamida, não provocou diferença significativa no efeito máximo e na potência do SNP no grupo Sham (Fig. 16A). O E_{max} na ausência da glibenclamida apresentou-se $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ e na presença $58,7 \pm 7,7\%$, $n=4$. Seu pD_2 para o controle foi $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ e na presença da glibenclamida foi $6,3 \pm 0,07$, $n=4$.

A resposta do TERPY (Fig. 16B) após o bloqueio dos canais K_{ATP} diminuiu significativamente tanto o efeito máximo, redução de 30%, quanto para a potência no grupo Sham. O E_{max} na ausência da glibenclamida apresentou valores de $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ e na presença $77,5 \pm 5,1\%$, $n=3$ ($p<0,001$ - Tab. 2). Para o pD_2 , os valores passaram de $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ para $4,7 \pm 0,05$, $n=3$ ($p<0,01$ - Tab. 2).

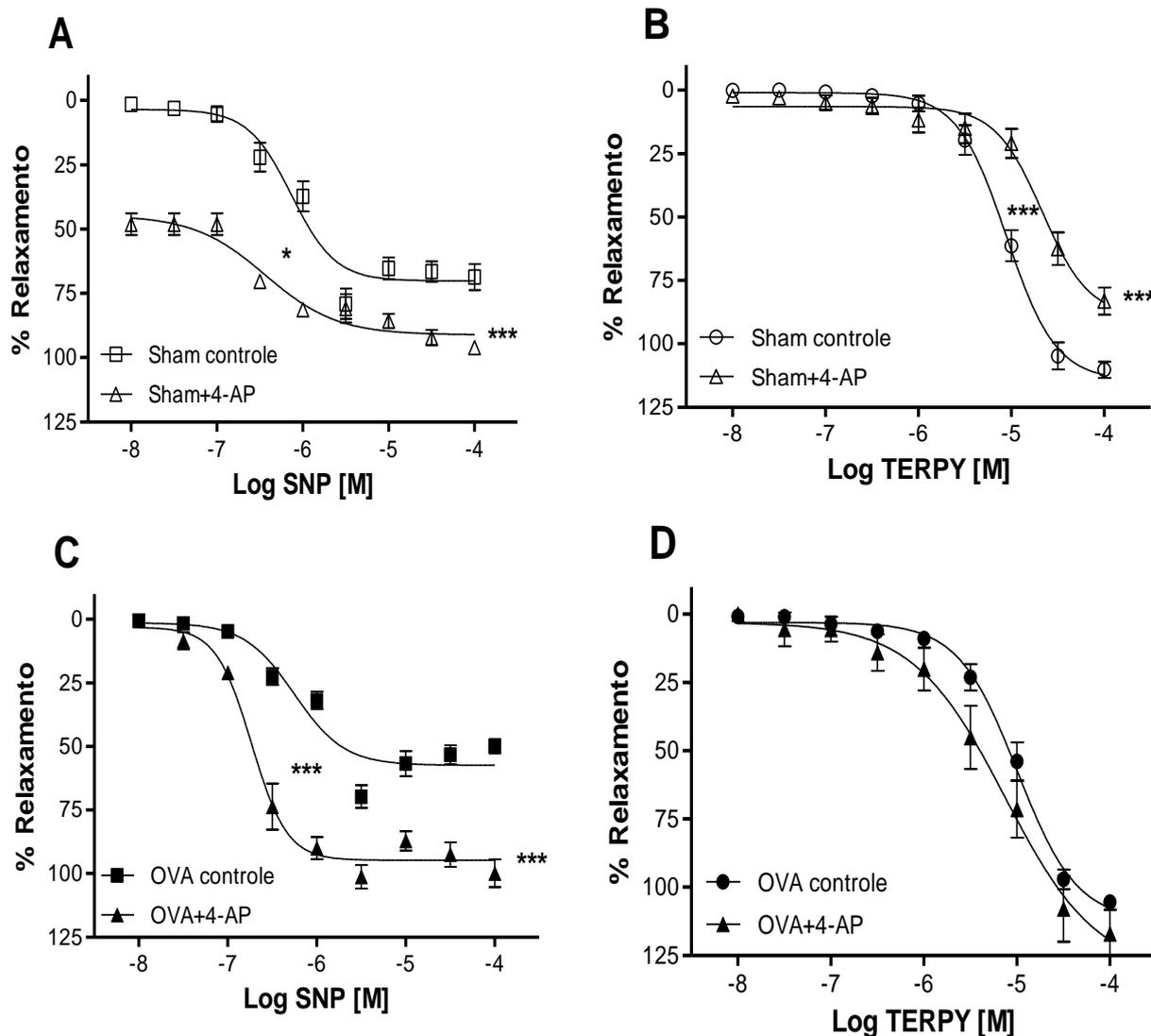
A glibenclamida não gerou alterações significativas no efeito máximo e na potência do SNP (Fig. 16C) nem do TERPY (Fig. 16D) em traqueias de ratos do grupo OVA (Tab. 2). O E_{max} da curva controle do SNP foi $49,9 \pm 2,7\%$, $n=9$ e em presença da glibenclamida foi $46,1 \pm 3,6\%$, $n=6$. Para o controle, o pD_2 foi $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ e para a glibenclamida $6,2 \pm 0,09$, $n=6$. Para o TERPY, o E_{max} do controle foi $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e em presença da glibenclamida $108,2 \pm 3,1\%$, $n=7$. O pD_2 controle do TERPY apresentou valores de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ e para a glibenclamida $4,9 \pm 0,17$, $n=6$.

Assim, os canais K_{ATP} parecem não participar do relaxamento do músculo liso traqueal provocado pelo SNP, seja em traqueias de ratos do grupo Sham ou OVA. Entretanto, para o TERPY, estes canais parecem ter um papel importante apenas para o relaxamento em traqueias de ratos do grupo Sham, o que não foi observado no grupo OVA, sugerindo uma dessensibilização desses canais pelo processo inflamatório.

4.5.4 Efeito do bloqueador dos canais para K^+ dependente de voltagem (K_v), 4-aminopiridina (4-AP)

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do bloqueador seletivo de canais para potássio dependentes de voltagem (K_v), 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM- incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 17A e 17B para o grupo Sham e na Fig. 17C e 17D para o grupo OVA.

Figura 17- Efeito da 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (controle) e na presença de 4-AP (1 mM - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A presença de 4-AP aumentou tanto a eficácia quanto a potência do SNP no grupo Sham (Fig. 17A). O E_{max} na ausência do 4-AP variou de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para $96,2 \pm 2,1\%$, $n=5$ ($p < 0,001$ – Tab. 2) na presença, um aumento de 41%. Para o pD₂, os valores passaram de $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para $6,4 \pm 0,07$, $n=5$ ($p < 0,05$ – Tab. 2).

A 4-AP induziu redução significativa tanto para o efeito máximo, quanto para a potência do TERPY no grupo Sham (Fig. 17B). O E_{max} na ausência da

4-AP variou de $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ para $88,2 \pm 2,4\%$, $n=4$ ($p<0,001$ - Tab. 2), uma redução de 20% na eficácia. Para o pD_2 , os valores passaram de $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ para $4,4 \pm 0,12$, $n=4$, ($p<0,001$ - Tab. 2).

Esses dados indicam que os canais K_V participam do efeito do SNP e do TERPY no grupo Sham.

De forma semelhante ao grupo Sham, na presença de 4-AP houve aumento tanto da eficácia quanto da potência do SNP no grupo OVA (Fig. 17C). O E_{max} na ausência do 4-AP aumentou de $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ para $99,9 \pm 5,4\%$, $n=5$ ($p<0,001$ – Tab. 2) na presença do inibido, produzindo um aumento de 100%. Para o pD_2 , os valores passaram de $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ para $6,7 \pm 0,08$, $n=5$ ($p<0,001$ – Tab. 2).

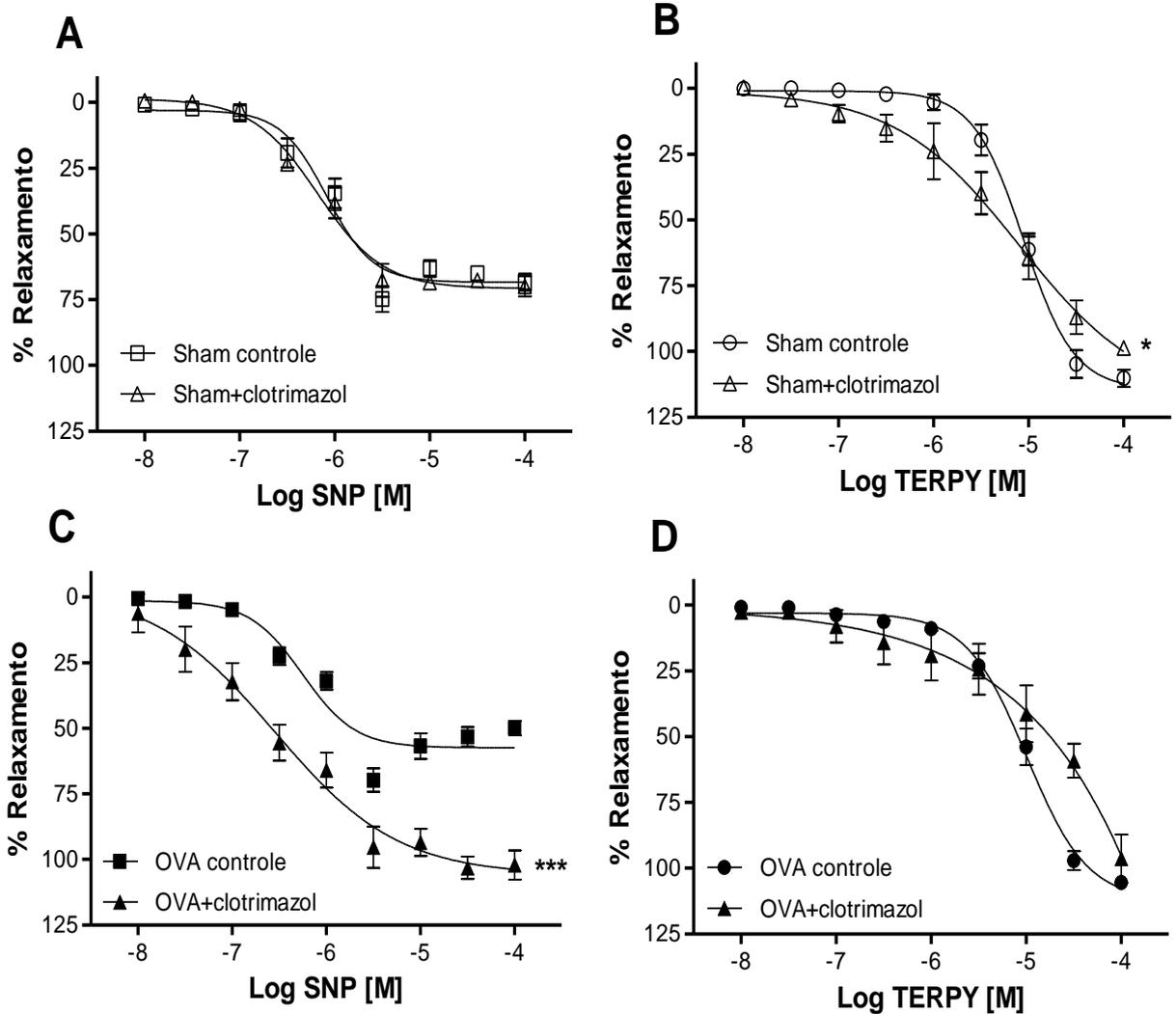
A Fig. 17D mostra que a 4-AP não provocou alterações significativas no efeito máximo nem na potência do TERPY em traqueias de animais do grupo OVA. O E_{max} da curva controle para o TERPY foi $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e em presença da 4-AP foi $109,5 \pm 1,8\%$, $n=5$. O pD_2 controle do TERPY variou de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ para 4-AP $5,2 \pm 0,22$, $n=5$.

Os dados com a 4-AP demonstram que os canais K_V têm participação semelhante para o relaxamento do músculo liso traqueal provocado pelo SNP tanto em traqueias do grupo Sham como no grupo OVA. Entretanto, para o TERPY, estes canais parecem ter um papel importante apenas para o relaxamento do grupo Sham, pois não foi observado diferenças nos parâmetros farmacológicos nas traqueias dos animais do grupo OVA, sugerindo dessensibilização desses canais pelo processo inflamatório.

4.5.5 Efeito do bloqueador dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}), clotrimazol

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do bloqueador seletivo de canais para potássio ativados por cálcio (K_{Ca}), clotrimazol ($5 \mu M$ -incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 18A e 18B para o grupo Sham e na Fig. 187C e 18D para o grupo OVA.

Figura 18- Efeito do clotrimazol sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (controle) e na presença de clotrimazol (5 μ M- 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001.

A única alteração que o clotrimazol, bloqueador seletico dos canais K_{Ca} provocou no grupo Sham foi a redução da eficácia do TERPY (Fig 18B). O E_{max} do TERPY decaiu de 110,2 \pm 3,2%, n=9 para 98,7 \pm 2,4%, n=4, (p<0,05 – Tab. 2) uma redução de 10% na eficácia. Para o pD₂ do TERPY, os valores do controle foram 5,1 \pm 0,06, n=9 e na presença do clotrimazol 5,2 \pm 0,34, n=4.

Para o SNP no grupo Sham (Fig. 18A), o E_{max} da curva controle foi $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ e na presença do clotrimazol $69,9 \pm 3,8\%$, $n=3$. Para o controle, o pD_2 apresentou-se $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ e na presença o bloqueador dos canais K_{Ca} $6,2 \pm 0,12$, $n=3$.

Assim, no grupo Sham, o canal K_{Ca} parece ter importância para a ação do TERPY.

A presença do clotrimazol alterou apenas a eficácia do SNP no grupo OVA (Fig. 18C). O E_{max} do SNP aumentou de $49,9 \pm 2,7\%$, $n=9$ para $102,1 \pm 5,6\%$, $n=4$ ($p < 0,001$ – Tab. 2), um aumento de 105% na eficácia. Para o pD_2 , os valores do controle foram $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ e para o clotrimazol $6,5 \pm 0,19$, $n=4$.

O clotrimazol não provocou alterações significativas no efeito máximo nem na potência do TERPY em traqueias de animais do grupo OVA (Fig. 18D). O E_{max} da curva controle para o TERPY foi $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e em presença do bloqueador dos canais K_{Ca} $108,6 \pm 6,2\%$, $n=3$. O pD_2 controle do TERPY apresentou valores de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ e para o clotrimazol $4,7 \pm 0,89$, $n=3$.

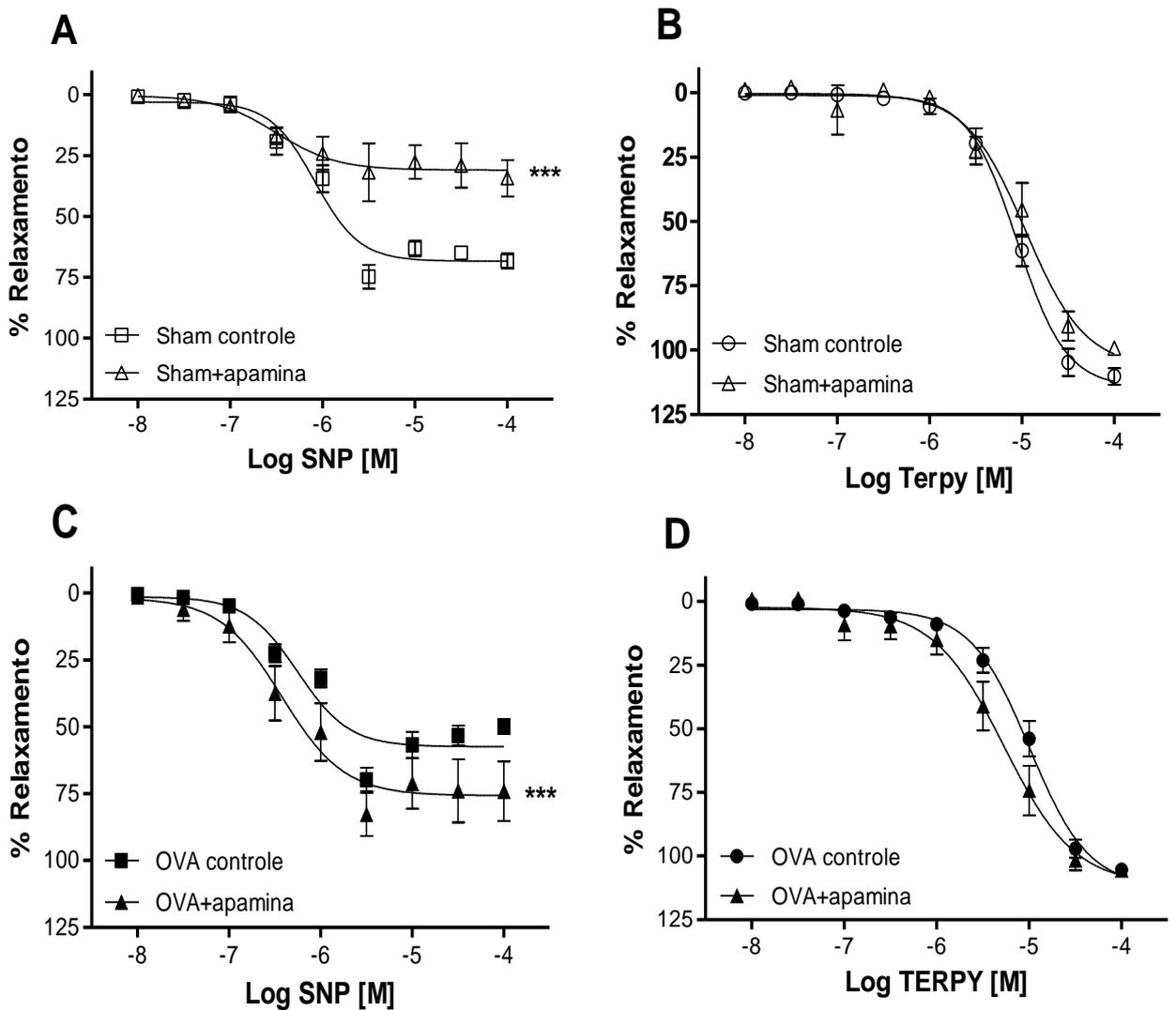
Parece que o bloqueio dos canais K_{Ca} em músculo liso traqueal inflamado não interfere no mecanismo de relaxamento do TERPY. Entretanto, por mecanismos não avaliados neste estudo, o clotrimazol aumenta a eficácia do SNP.

Os resultados com o clotrimazol demonstram que os canais K_{Ca} podem ter diferentes participações para o relaxamento do músculo liso traqueal provocado pelo SNP e pelo TERPY. Para este doador, os canais K_{Ca} parecem ter um papel importante apenas para o relaxamento do grupo Sham, pois no grupo OVA, a presença do clotrimazol não levou a diferenças significativas nos parâmetros de eficácia e potência do TERPY, sugerindo dessensibilização desses canais pelo processo inflamatório.

4.5.6 Efeito do bloqueador dos canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de baixa condutância (SK_{Ca}), apamina

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do bloqueador seletivo de canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância (SK_{Ca}), apamina (0,5 μM- incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 19A e 19B para o grupo Sham e na Fig. 19C e 19D para o grupo OVA.

Figura 19- Efeito da apamina sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (controle) e na presença de apamina (0,5 μM- 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μM) em ambos os grupos. Os pontos representam médias ± EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001.

A apamina, unibidor seletivo dos canais SK_{Ca}, alterou apenas a eficácia do SNP no grupo Sham (Fig 19A). O E_{max} do SNP foi de 68,3 ± 3,1%, n=9 e na presença da apamina 34,2 ± 7,5%, n=4, (p<0,001 – Tab. 2), uma redução de 50%. O pD₂ foi 6,1 ± 0,07, n=9 para o controle e 5,7 ± 0,73, n=4 em presença de apamina.

O TERPY não teve seus parâmetros farmacológicos de potencia e eficácia modificados pela apamina no grupo Sham (Fig. 19B). O E_{max} da curva controle para o TERPY foi 110,2 ± 3,2%, n=9 e em presença a apamina 99,3 ± 1,5%, n=4. O pD₂ controle do TERPY apresentou valores de 5,1 ± 0,06, n=9 e em presença de apamina 5,0 ± 0,11, n=4.

Esses resultados sugerem que os canais SK_{Ca} em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham não interfere no mecanismo de relaxamento do TERPY, porém, são importantes para o SNP.

No grupo OVA, a apamina alterou apenas a eficácia do SNP (Fig 19C). O E_{max} do SNP aumentou de 49,9 ± 2,7%, n=9 para 76,4 ± 7,8%, n=4, (p<0,001 – Tab. 2), um aumento de 53% na eficácia. Para o pD₂, os valores do controle foram 6,2 ± 0,06, n=6 e para a apamina foram 6,3 ± 0,09, n=4.

A apamina não alterou significativamente no efeito máximo nem na potência do TERPY no grupo OVA (Fig. 19D). O E_{max} da curva controle para o TERPY foi 106,1 ± 1,5%, n=9 e em presença do bloqueador dos canais SK_{Ca} foi 105,6 ± 1,6%, n=6. O pD₂ controle do TERPY apresentou valores de 5,0 ± 0,09, n=9 e na presença da apamina 5,2 ± 0,14, n=6.

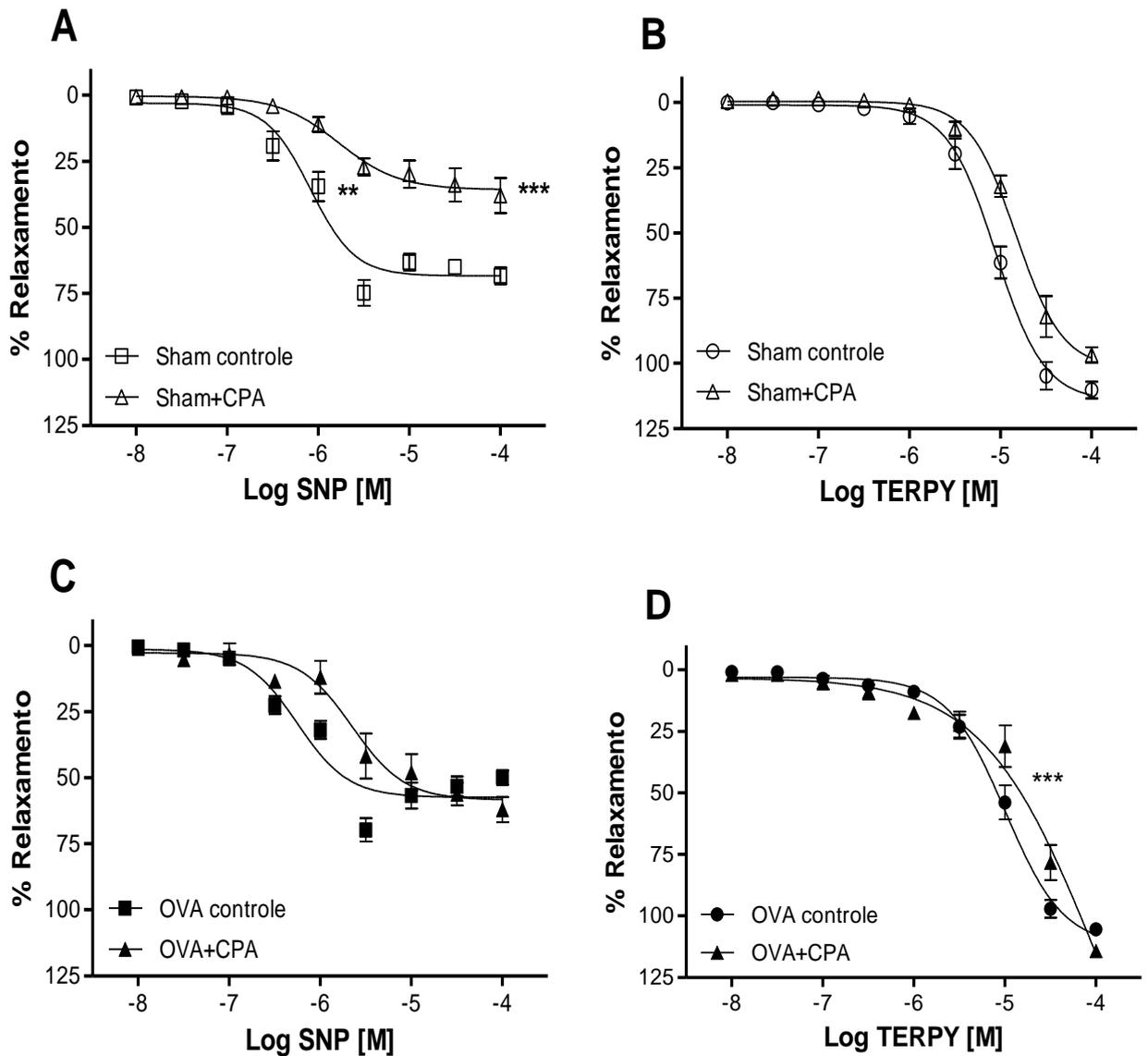
Esses achados indicam que os canais SK_{Ca} em músculo liso traqueal inflamado não interfere no mecanismo de relaxamento do TERPY. Entretanto, por algum mecanismo não avaliado neste estudo, assim como o TEA, a 4-AP e o clotrimazol, a apamina aumenta a eficácia do SNP.

4.6 EFEITO DO INIBIDOR DA CÁLCIO-ATPASE DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO, ÁCIDO CICLOPIAZÔNICO (CPA)

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do inibidor da

bomba de Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), ácido ciclopiazônico (CPA - $10 \mu\text{M}$ - incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 20A e 20B para o grupo Sham e na Fig. 20C e 20D para o grupo OVA.

Figura 20- Efeito do CPA sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (controle) e na presença de CPA ($10 \mu\text{M}$ - 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol ($0,5 \mu\text{M}$) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático parece participar do relaxamento do músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham provocado apenas pelo SNP (Fig. 20A), pois o CPA alterou a potência e a eficácia deste doador de NO. O E_{max} do SNP reduziu de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para $39,9 \pm 6,6\%$, $n=4$ ($p<0,001$ -Tab. 2) na presença do CPA. Seu pD_2 reduziu de $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para $5,8 \pm 0,07$, $n=4$ ($p<0,01$ -Tab. 2).

A presença do CPA não alterou o efeito máximo nem a potência do TERPY no grupo Sham (Fig. 20B). A curva controle do TERPY apresentou E_{max} de $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ e em presença do inibidor $96,9 \pm 3,0\%$, $n=3$. Seu pD_2 controle foi $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ e em presença do CPA foi $4,9 \pm 0,04$, $n=3$ (Tab. 2).

A presença do CPA não alterou o efeito máximo nem a potência do SNP em animais do grupo OVA (Fig. 20C). A curva controle do SNP apresentou E_{max} de $49,9 \pm 2,7$, $n=6$ e em presença do inibidor $62,2 \pm 4,8\%$, $n=4$. Seu pD_2 controle foi $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ e em presença do CPA $5,8 \pm 0,22$, $n=4$ (Tab. 2).

No relaxamento produzido pelo TERPY, o CPA alterou apenas sua potência (Fig. 20D). O pD_2 reduziu de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ para $3,9 \pm 0,21$, $n=4$ ($p<0,001$ -Tab. 2), evidenciando um deslocamento da curva para a direita. O E_{max} no grupo OVA na ausência de CPA foi de: $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ e na presença do inibidor foi de $114,2 \pm 1,5\%$, $n=4$.

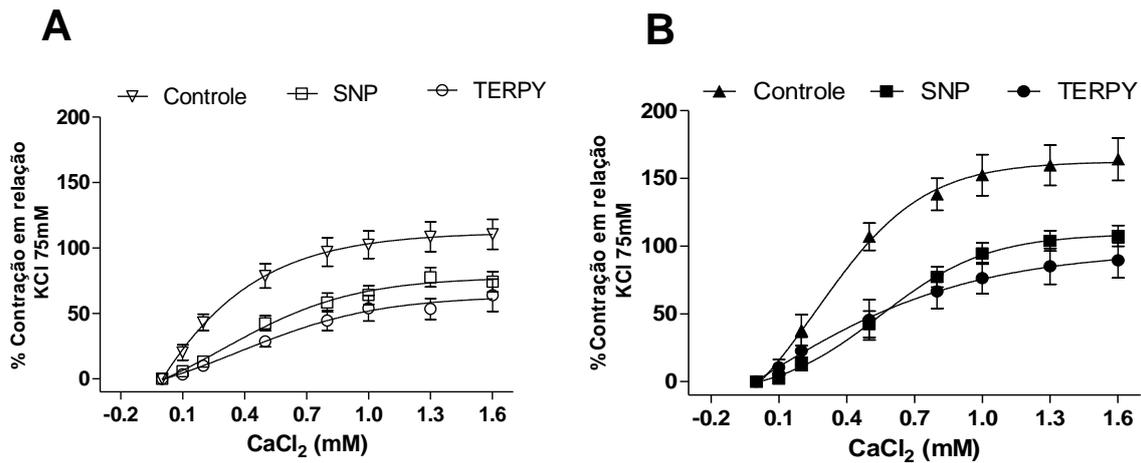
De acordo com esses resultados, observa-se que a SERCA tem diferentes participações no relaxamento do músculo liso traqueal do grupo Sham e OVA para ambos os doadores de NO. Vê-se que esta bomba deixa de ser importante para o relaxamento provocado pelo SNP no grupo OVA, e inversamente, passa a ter efeito sobre o relaxamento provocado pelo TERPY.

4.7 EFEITO DO SNP E DO TERPY SOBRE A CONTRAÇÃO EXERCIDA POR KCl 75 mM OU CARBACOL 0,5 μ M EM TRAQUEIAS DO GRUPO SHAM E OVA

4.7.1 Em presença de KCl 75 mM

A resposta contrátil ao aumento cumulativo de CaCl_2 em traqueias isoladas de ratos do grupo Sham e do grupo OVA, em presença de KCl (75 mM), pode ser vista na Fig. 21.

Figura 21: Curva de contração induzida por concentrações crescentes de Ca^{2+} em presença de KCl 75 mM em solução de Krebs a zero Ca^{2+} em traqueias isoladas de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Os dados representam a resposta contrátil a concentrações cumulativas de CaCl_2 na ausência (controle) e na presença (20 min) de SNP ou TERPY ambos a 100 μM em presença de solução de Krebs com KCl 75 mM para o grupo Sham (A) e para o grupo OVA (B). Os pontos representam médias \pm EPM da resposta contrátil expressos em porcentagem em relação à máxima contração exercida por 75 mM de KCl.

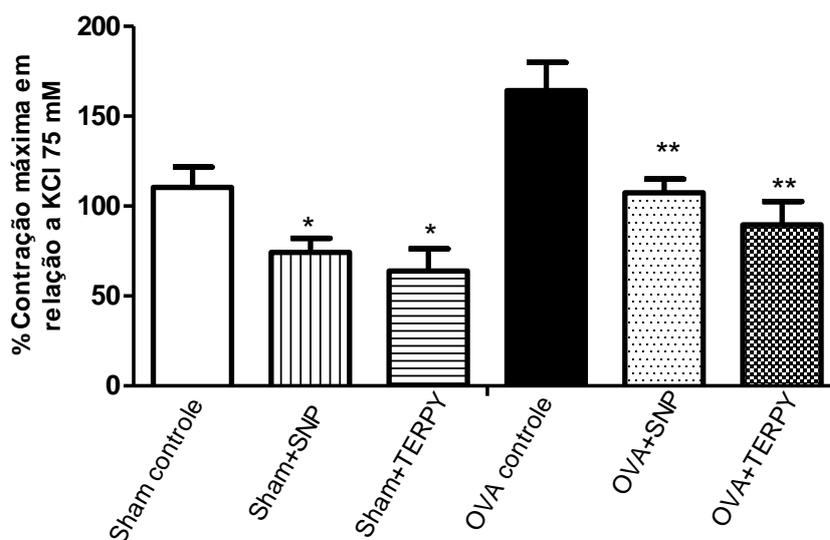
A Fig. 21A representa a resposta contrátil máxima do CaCl_2 nas traqueias dos animais controles do grupo Sham em que os valores de E_{max} foram $110,4 \pm 11,4\%$, $n=5$. As traqueias de ratos do grupo Sham incubadas com a EC_{100} do SNP apresentaram redução significativa de 33% na contração máxima ($74,2 \pm 7,8\%$, $n=5$ - $p<0,05$ - Fig. 22) e as traqueias de ratos do grupo Sham incubadas com a EC_{100} do TERPY (100 μM por 20 min) tiveram redução significativa de 42% ($63,9 \pm 12,4\%$, $n=4$ - $p<0,05$ Fig. 22).

Esses resultados sugerem que o SNP e o TERPY interferem no influxo de Ca^{2+} através do canal de cálcio operado por voltagem estimulado pela despolarização da membrana plasmática com KCl 75 mM em traqueias isoladas de ratos do grupo Sham.

A curva de contração so CaCl_2 controle do grupo OVA (Fig. 21B) apresenta a resposta contrátil com E_{max} igual a $164,2 \pm 15,7\%$, $n=4$. As traqueias do grupo OVA incubadas com a EC_{100} do SNP apresentaram contração máxima de $107,4 \pm 7,7\%$, $n=6$, ($p < 0,01$ – Fig. 22) uma redução significativa de 35%. As traqueias do grupo OVA incubadas com a EC_{100} do TERPY apresentaram contração máxima de $89,6 \pm 13,0\%$, $n=4$ ($p < 0,01$ – Fig. 22), uma redução significativa de 45%.

Assim, como no grupo Sham, estes resultados sugerem que o SNP e o TERPY interferem no influxo de Ca^{2+} através do canal de cálcio operado por voltagem estimulado pela despolarização da membrana plasmática com KCl 75 mM em traqueias isoladas de ratos do grupo OVA.

Figura 22- Contração máxima induzida por Ca^{2+} nos grupos Sham e OVA em presença de KCl 75 mM em solução de Krebs a zero Ca^{2+} .

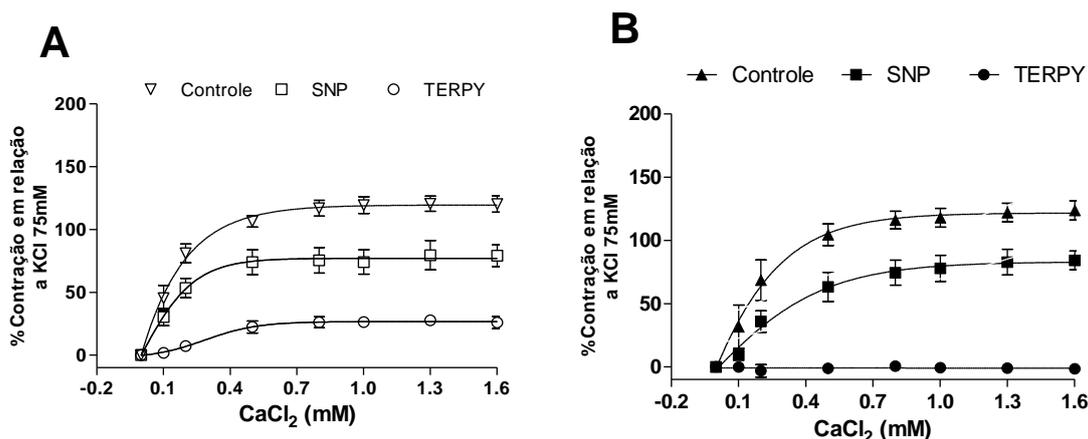


Legenda: Resposta contrátil máxima a concentrações cumulativas de CaCl_2 na ausência (controle) e na presença (20 min) de SNP ou TERPY (ambos EC_{100} - 100 μM) em solução de Krebs contendo KCl (75 mM). As barras verticais representam a média \pm EPM da resposta contrátil expressas em porcentagem em relação à máxima contração exercida por 75 mM de KCl. Diferença estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação aos respectivos controles.

4.7.2 Em presença de 0,5 μM de carbacol

A resposta contrátil ao aumento cumulativo de CaCl_2 em traqueia de ratos do grupo Sham e do grupo OVA, na presença da EC_{50} de carbacol (0,5 μM) pode ser vista na Fig. 23.

Figura 23- Curva de contração induzida por concentrações crescentes de Ca^{2+} em presença de carbacol 0,5 μM em solução de Krebs a zero Ca^{2+} em traqueias isoladas de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Os dados representam a resposta contrátil a concentrações cumulativas de CaCl_2 na ausência (controle) e na presença (20 min) de SNP ou TERPY ambos a 100 μM em presença de solução de Krebs com carbacol 0,5 μM para o grupo Sham (A) e para o grupo OVA (B). Os pontos representam médias \pm EPM da resposta contrátil expressos em porcentagem em relação a contração exercida por 75 mM de KCl.

A curva de contração ao CaCl_2 controle do grupo Sham (Fig. 23A) apresenta valores de E_{max} $117,9 \pm 6,0\%$, $n=5$. As traqueias de ratos do grupo Sham incubadas com a EC_{100} do SNP apresentaram redução significativa de 35% na contração máxima ($76,9 \pm 9,6\%$, $n=5$ - $p<0,001$ – Fig. 24). As traqueias de ratos do grupo Sham incubadas com a EC_{100} do TERPY apresentaram redução significativa de 77% ($27,4 \pm 4,1\%$, $n=4$ - $p<0,001$ Fig. 24).

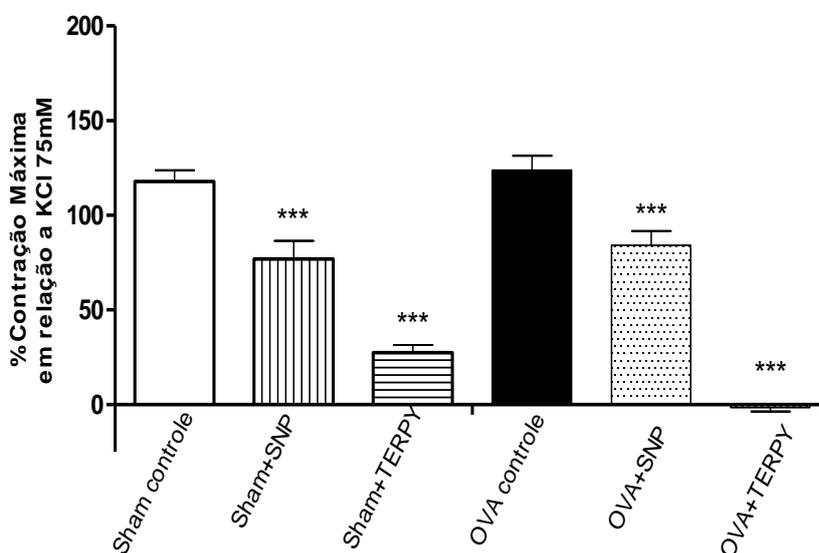
Esses resultados sugerem a participação dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem e por estoque no relaxamento mediado tanto pelo SNP quanto pelo TERPY.

A curva controle do grupo OVA (Fig. 23B) apresenta resposta contrátil com E_{max} igual a $123,7 \pm 7,6\%$, $n=3$. As traqueias do grupo OVA incubadas com a EC_{100} do SNP apresentaram contração máxima de $84,1 \pm 7,4\%$, $n=3$,

($p < 0,001$ – Fig. 24), uma redução significativa de 33%. As traqueias do grupo OVA incubadas com a EC_{100} do TERPY apresentaram contração máxima de $-1,6 \pm 2,1\%$, $n=3$, ($p < 0,001$ – Fig. 24), uma redução significativa de 101%.

Esses resultados sugerem a participação dos canais de Ca^{2+} regulados por estoque e por voltagem no relaxamento mediado tanto pelo SNP quanto pelo TERPY. Entretanto, esta participação parece ser mais importante para o TERPY.

Figura 24- Contração máxima da curva para Ca^{2+} no grupo Sham e OVA em presença de carbacol $0,5 \mu M$ em solução de Krebs a zero Ca^{2+} .



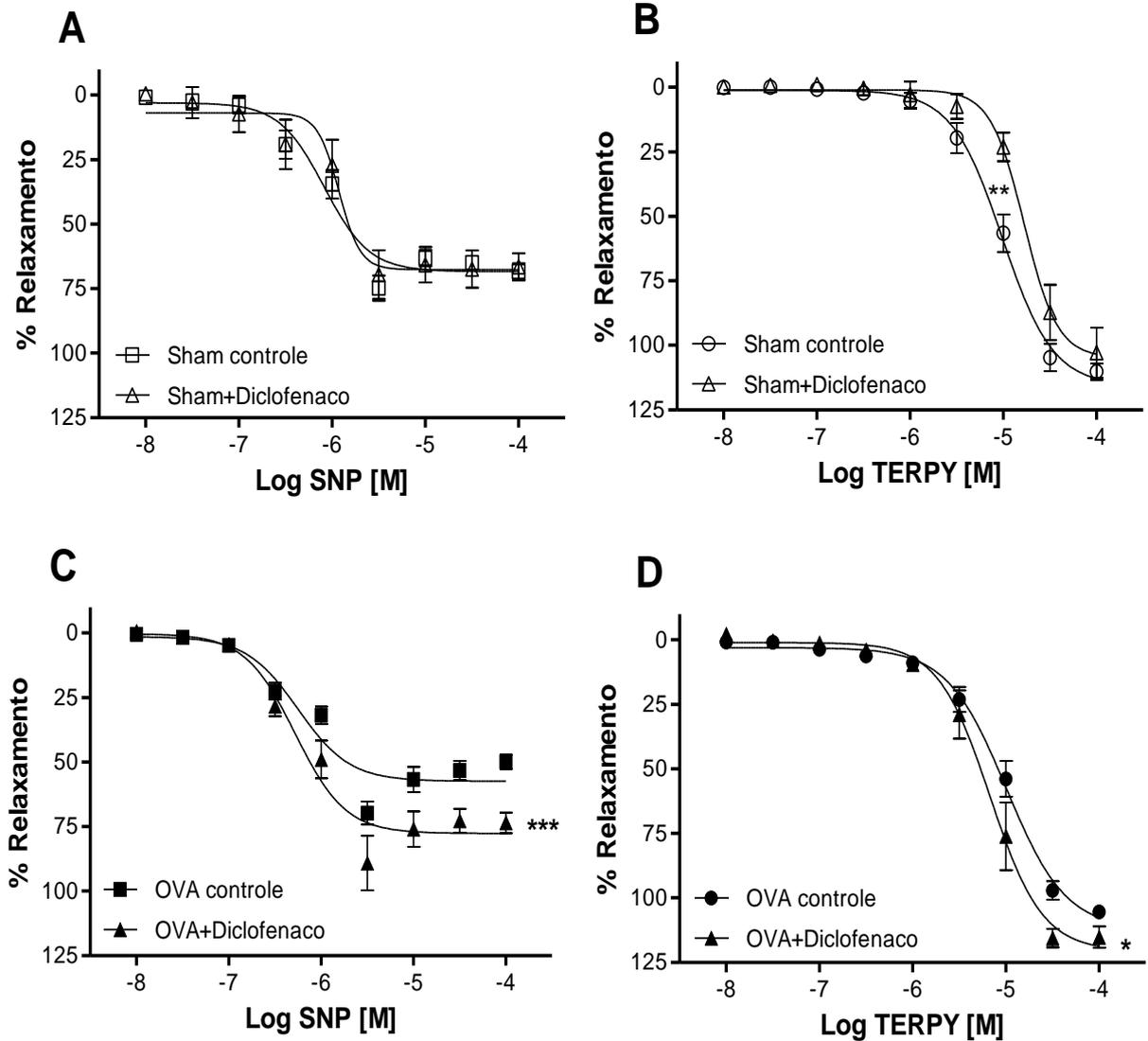
Legenda: Resposta contrátil máxima a concentrações cumulativas de $CaCl_2$ na ausência (controle) e na presença (20 min) de SNP ou TERPY (EC_{100} - $100 \mu M$) em solução de Krebs contendo KCl (75 mM). As barras verticais representam a média \pm EPM da resposta contrátil expressos em porcentagem em relação à máxima contração exercida por 75 mM de KCl. Diferença estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

4.8 EFEITO DE DIFERENTES INIBIDORES DA INFLAMAÇÃO SOBRE O RELAXAMENTO DO SNP E DO TERPY EM TRAQUEIAS DE RATOS DOS GRUPOS SHAM E OVA

4.8.1 Efeito do inibidor das ciclooxigenases, diclofenaco

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX), diclofenaco de sódio ($10 \mu M$ - incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 25A e 25B para o grupo Sham e na Fig. 25C e 25D para o grupo OVA.

Figura 25- Efeito do diclofenaco sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (controle) e na presença de diclofenaco (10 μ M- 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por *p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001.

A presença de diclofenaco alterou apenas na potência do TERPY no grupo Sham. Seu pD₂ reduziu de 5,1 \pm 0,06, n=9 para 4,8 \pm 0,04, n= 5 (p<0,01- Tab. 3), uma redução evidenciada pelo desvio da curva para a direita (Fig. 25B). A curva controle para o TERPY apresentou E_{max} de 110,2 \pm 3,2%, n=9 e em presença do inibidor 102,9 \pm 9,7%, n=5.

O SNP no grupo Sham (Fig. 25A) apresentou E_{max} de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para a curva controle e de $66,6 \pm 5,2\%$, $n=4$ na presença do diclofenaco. Seu pD_2 apresentou-se $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para o controle e $5,8 \pm 0,11$, $n=4$ na presença do inibidor de COX empregado (Tab. 3).

O inibidor da COX alterou o efeito máximo de ambos os doadores de NO em traqueias de animais do grupo OVA, porém não interferiu em suas potências. Para o SNP (Fig. 25C), o E_{max} para o controle foi de $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ e em presença do inibidor $62,2 \pm 4,8\%$, $n=4$ ($p<0,001$ -Tab. 3), um aumento de 25% do efeito máximo. Para o TERPY (Fig. 25D) houve variação de $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ para $115,2 \pm 4,1\%$, $n=5$ ($p<0,05$ -Tab. 3) em presença do diclofenaco, um aumento de 9%. O pD_2 do SNP controle foi $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ e em presença do diclofenaco foi $6,2 \pm 0,08$, $n=5$. O TERPY apresentou pD_2 de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ para o controle e de $5,2 \pm 0,13$, $n=5$ (Tab. 3).

O diclofenaco, com seu efeito anti-inflamatório por inibição da COX, parece favorecer o relaxamento do músculo liso traqueal inflamado para ambos os doadores de NO.

Tabela 3- Efeito máximo (E_{max}) e potência (pD_2) do SNP e TERPY nos grupos Sham e OVA na ausência (controle) e presença de diferentes ferramentas farmacológicas.

	SNP Sham		SNP OVA	
	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)	pD_2
Controle	68,3 ± 3,1 (n=9)	6,1 ± 0,07, n=9	49,9 ± 2,7 (n=6)	6,2 ± 0,06, n=6
Diclofenaco	66,6 ± 5,2 (n=4)	6,0 ± 0,11, n=4	73,6 ± 4,0 (n=5)***	6,2 ± 0,08, n=5
Montelucaste	88,0 ± 7,2 (n=4)**	6,4 ± 0,15, n=4	85,6 ± 7,1 (n=5)***	6,4 ± 0,08, n=5
TIRON	57,9 ± 0,7%, (n=4)	6,0 ± 0,07, n=4	83,2 ± 5,7 (n=4)***	6,3 ± 0,12, n=4

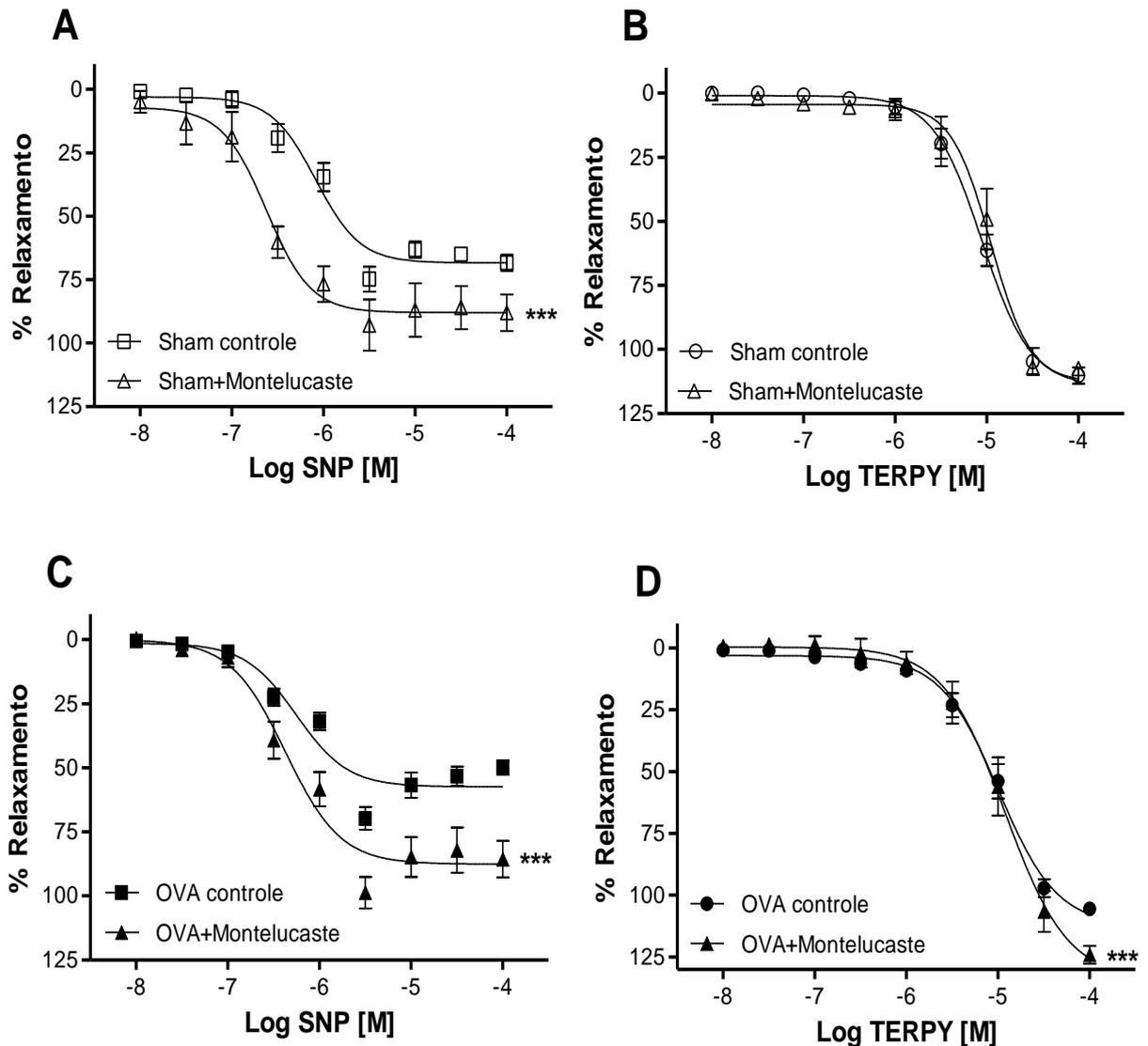
	TERPY Sham		TERPY OVA	
	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)	pD_2
Controle	110,2 ± 3,2 (n=9)	5,1 ± 0,06, n=9	106,1 ± 1,5 (n=9)	5,0 ± 0,09, n=9
Diclofenaco	102,9 ± 9,7 (n=5)	4,8 ± 0,04, n=5**	115,2 ± 4,1 (n=5)*	5,2 ± 0,13, n=5
Montelucaste	107,5 ± 1,4 (n=4)	5,0 ± 0,10, n=4	124,1 ± 3,6 (n=5)**	4,9 ± 0,14, n=5
TIRON	104,0 ± 3,2 (n=4)	4,8 ± 0,04, n=4*	118,8 ± 2,2 (n=5)**	5,3 ± 0,07, n=5*

Legenda: Os dados representam médias ± EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. Significância estatística comprando as diferentes ferramentas farmacológicas com o controle de cada grupo, em que * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.8.2 Efeito do antagonista dos receptores de leucotrienos, montelucaste

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do antagonista do receptor de leucotrieno $CysLT_1$, montelucaste (10 μM - incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 26A e 26B para o grupo Sham e na Fig. 26C e 26D para o grupo OVA.

Figura 26- Efeito do montelucaste sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (controle) e na presença de montelucaste (10 μ M- 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Em animais do grupo Sham, o antagonismo dos receptores de leucotrienos alterou apenas o E_{max} do SNP (Fig.26A), levando a um aumento de 29% do efeito. Na ausência do montelucaste, o E_{max} foi de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ e na presença foi de $88,0 \pm 7,2\%$, $n=4$ ($p < 0,01$ -Tab. 3). O TERPY (Fig.26B) apresentou E_{max} de $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ na ausência do antagonista e na presença $107,5 \pm 1,4$, $n=4$.

O pD_2 do SNP no grupo Sham na ausência do montelucaste foi $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ e na sua presença foi $6,4 \pm 1,5$, $n=4$. Para o TERPY, o controle foi $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ e na presença do Montelucaste $5,0 \pm 0,10$, $n=4$ (Tab.3).

Nos animais do grupo OVA, a presença do montelucaste aumentou a eficácia tanto do SNP (Fig.26C) como do TERPY (Fig.26D). O E_{max} do SNP variou de $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ para $85,6 \pm 7,2\%$, $n=4$ ($p<0,01$ -Tab. 3) na presença do antagonista, um aumento de 71% no efeito máximo. O TERPY aumentou de $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ para $124,1 \pm 3,6\%$, $n=5$ ($p<0,01$ -Tab. 3) em presença de montelucaste, um aumento de 17%.

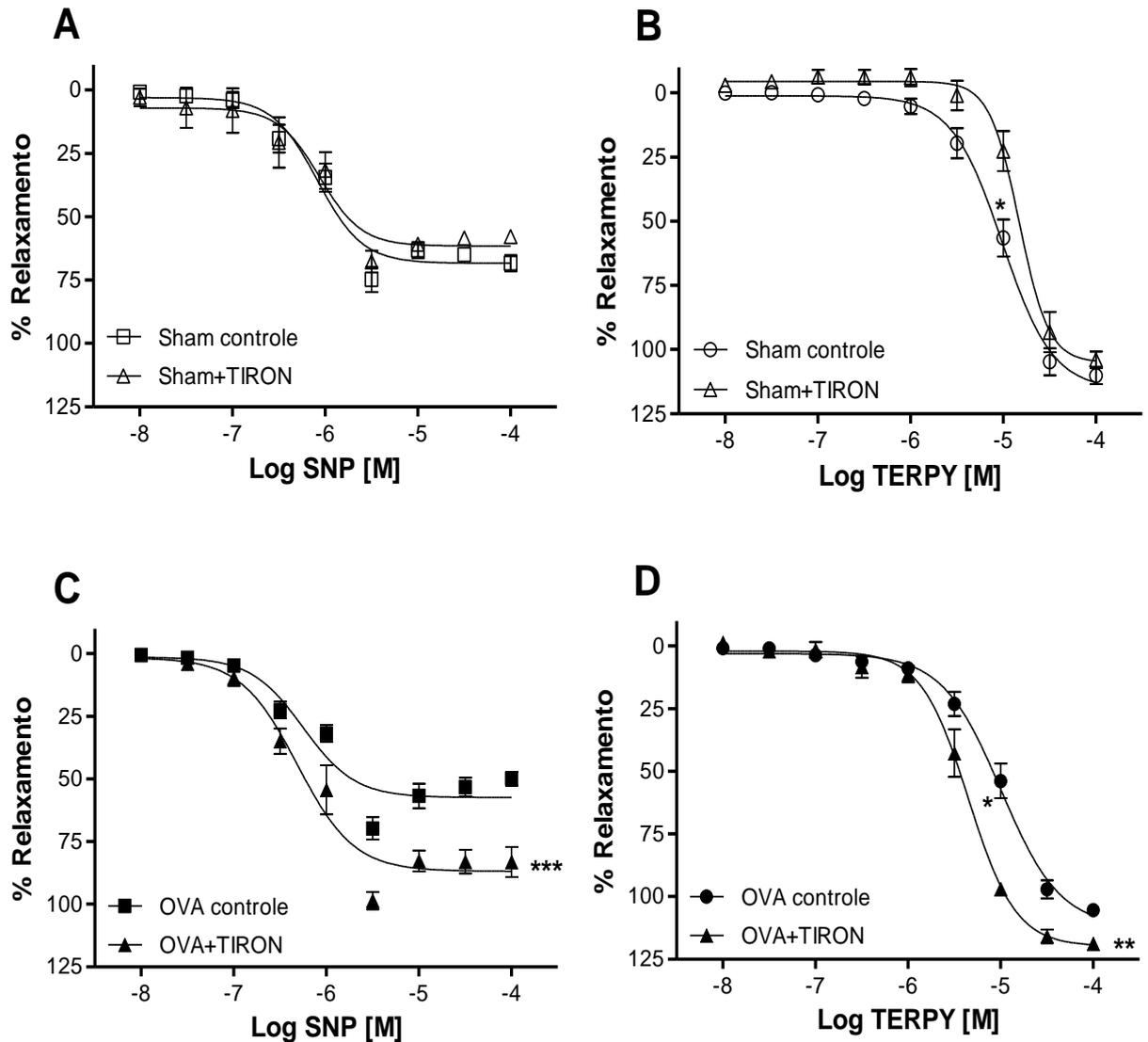
Não houve alteração da potência das drogas no grupo OVA. O pD_2 do SNP controle foi $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ e em presença do montelucaste $6,4 \pm 0,08$, $n= 5$. O TERPY apresentou pD_2 de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ para o controle e de $4,9 \pm 0,13$, $n= 5$ (Tab. 3).

Diante dos resultados apresentados, a utilização do montelucaste parece ser uma alternativa importante para melhorar o relaxamento do músculo liso traqueal inflamado juntamente com os doadores de NO por aumentar seu efeito relaxante.

4.8.3 Efeito do sequestrador dos ânions superóxidos, TIRON

Os percentuais de relaxamento do músculo liso traqueal produzidos pelo SNP ou TERPY, na ausência (controle) e na presença do sequestrador dos ânions superóxidos (O_2^-), TIRON (1 mM- incubado por 30 min), estão apresentados na Fig. 27A e 27B para o grupo Sham e na Fig. 27C e 27D para o grupo OVA.

Figura 27- Efeito do TIRON sobre o relaxamento induzido pelo SNP e TERPY em traqueias de ratos dos grupos Sham e OVA.



Legenda: Curvas concentração-efeito cumulativas para o SNP no grupo Sham (A) e no grupo OVA (C) e para o TERPY no grupo Sham (B) e no grupo OVA (D) na ausência (controle) e na presença de TIRON (1 mM- 30 min) em preparações de traqueia pré-contraídas com carbacol (0,5 μ M) em ambos os grupos. Os pontos representam médias \pm EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem e diferença estatística representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O sequestro do ânion O_2^- parece exercer pouco efeito no relaxamento provocado pelo SNP e TERPY em traqueias do grupo Sham. Houve apenas a alteração da potência do TERPY (Fig. 27B). Seu pD_2 reduziu de $5,1 \pm 0,06$, $n=9$ para $4,8 \pm 0,04$, $n= 4$ ($p < 0,05$ -Tab. 3). A curva controle para o TERPY apresentou E_{max} de $110,2 \pm 3,2\%$, $n=9$ e em presença do TIRON $104,0 \pm 3,2\%$, $n=4$.

O SNP no grupo Sham (Fig. 27A) apresentou E_{max} de $68,3 \pm 3,1\%$, $n=9$ para a curva controle e de $57,9 \pm 0,7\%$, $n=4$ na presença do TIRON. Seu pD_2 apresentou-se $6,1 \pm 0,07$, $n=9$ para o controle e $6,0 \pm 0,07$, $n=4$ na presença do sequestrador de O_2^- (Tab. 3).

Em animais do grupo OVA, a presença do TIRON melhorou os efeitos do SNP (Fig. 27C) e do TERPY (Fig. 27D). A melhor resposta foi demonstrada no efeito do TERPY, em que foi observado aumento tanto do efeito máximo quanto da sua potência. Seu E_{max} aumentou de $106,1 \pm 1,5\%$, $n=9$ em curva controle e para $118,8 \pm 2,2\%$, $n=5$ ($p<0,01$ -Tab. 3) na presença do TIRON, um aumento de 12% no efeito máximo. O pD_2 aumentou de $5,0 \pm 0,09$, $n=9$ no controle para $5,3 \pm 0,07$, $n=5$ ($p<0,05$ -Tab. 3) na presença do TIRON.

Para o SNP no grupo OVA, a presença do TIRON aumentou sua eficácia, porém não modificou sua potência. Nos animais controles, o E_{max} do SNP foi $49,9 \pm 2,7\%$, $n=6$ e em presença do sequestrador de O_2^- foi $83,2 \pm 5,7\%$, $n=4$, um aumento de 67% ($p<0,001$ -Tab. 3). O pD_2 , na ausência de TIRON foi $6,2 \pm 0,06$, $n=6$ e na sua presença foi $6,3 \pm 0,12$, $n=4$.

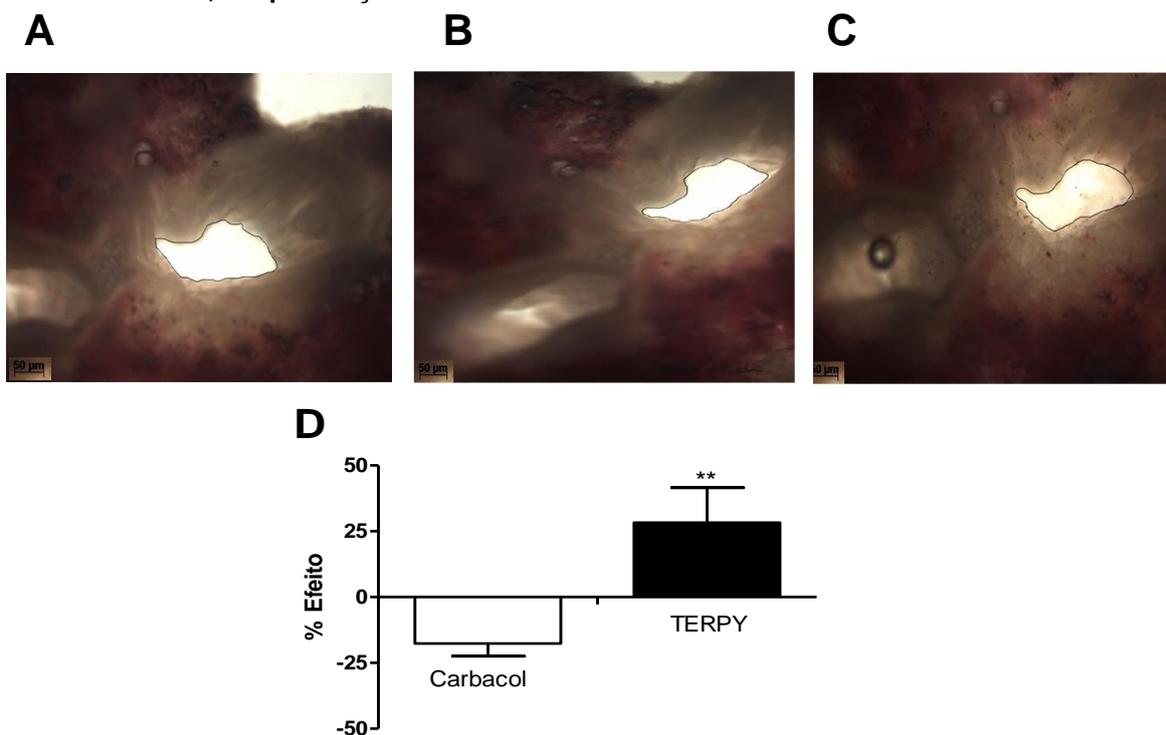
Os resultados com TIRON demonstram que os ânions superóxido têm importância na resposta relaxante do SNP e do TERPY em traqueias do grupo OVA, mas primordialmente para o TERPY em comparação com as traqueias do grupo Sham.

4.9 RELAXAMENTO BRONQUIOLAR INDUZIDO PELO TERPY

A Fig. 28 representada fotomicroscopias de um brônquiólo de animal do grupo OVA. A Fig. 28A mostra um bronquíolo antes a adição de carbacol com área de $14.456,36 \mu\text{m}^2$. A Fig. 28B mostra a redução da luz bronquiolar exercida pelo carbacol em 180 s, com nova área de $11.603,65 \mu\text{m}^2$. A Fig. 28C mostra o aumento da luz bronquiolar exercida pela presença do TERPY com área final de $13.196,14 \mu\text{m}^2$.

A redução da luz bronquiolar média exercida pelo carbacol nos diferentes bronquíolos foi de $-17,6 \pm 4,9\%$, $n=4$. O aumento da luz bronquiolar provocada pela EC_{100} do TERPY ($100 \mu\text{M}$) em 360 s após o início do experimento, ou seja, o do TERPY atuou por 180 s foi de $28,3 \pm 13,2\%$, $n=4$, $p<0,01$ (Fig. 28D). Esses resultados sugerem que o TERPY é capaz de reverter a contração do agonista colinérgico carbacol.

Figura 28- Fotomicroscopia da luz bronquiolar de rato do grupo OVA antes da adição do carbacol, em presença deste carbacol e de TERPY.



Legenda: As imagens mostram fotografias de cortes (aproximadamente 1 mm) de bronquíolos do grupo OVA (A) no tempo zero, ou seja, antes da adição da EC_{50} de carbacol com $14.456,36 \mu\text{m}^2$ de área; (B) fotomicroscopia do mesmo bronquíolo 180 s após a adição do carbacol com $11.603,65 \mu\text{m}^2$ de área e (C) fotomicroscopia 360 s após o início do experimento, em que a EC_{100} do TERPY atuou por 180 s com área final de $13.196,14 \mu\text{m}^2$. (D) representa graficamente o percentual de redução da luz bronquiolar exercida pelo carbacol e o aumento da luz exercida pelo TERPY. Diferença estatística representada por $**p < 0,01$.

Esta discussão está dividida em duas partes, a primeira intitulada mecanismos intracelulares de relaxamento e a segunda, mecanismos inflamatórios e oxidativos. Esta divisão tem a finalidade de tornar a compreensão do texto mais fácil e didática. A primeira e maior parte concentra-se em discutir os mecanismos de ação dos dois doadores de NO, o SNP e o TERPY, em músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA e compará-los aos mecanismos em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham. A segunda parte desta discussão teve o foco nas vias que podem alterar o efeito dos doadores de NO em induzir relaxamento do músculo liso traqueal por associarem mecanismos que reduzem a inflamação e o processo oxidativo.

5.1 MECANISMOS INTRACELULARES DE RELAXAMENTO

O NO é um importante modulador de respostas fisiológicas. Ele está relacionado com o controle da pressão arterial regulando o tônus, a homeostase vascular, o fluxo sanguíneo basal e a contratilidade cardíaca (FURCHGOTT, 1999; SHAH, 1996). Uma redução na biodisponibilidade do NO parece estar relacionada a fatores diabetogênicos como a hiperglicemia (BRODSKY et al., 2001) e a formação de produtos finais de glicação avançada (BUCALA, TRACEY e CERAMI, 1991), além da disfunção endotelial e macroangiopatia (XIONG et al., 2005) e ao estresse oxidativo (CERIELLO et al., 2001).

Nas vias aéreas, o NO controla o tônus do músculo liso traqueal levando ao relaxamento em casos de broncoconstrição, controla a frequência de batimentos ciliares, auxilia no transporte de eletrólitos pelo epitélio e participa da resposta imune inata, despertando interesse terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias respiratórias como a asma na busca de compostos mais seguros (HELMS et al., 2005; HARDIMAN et al., 2004; ROSE et al., 2002; LI et al., 2000; ZHOU e TORPHY, 1991).

A maior fonte de NO no trato respiratório é o epitélio (FOLKERTS e NIJKAMP, 1998) e o mecanismo intracelular pelo qual o NO pode provocar todos esses efeitos nas vias respiratórias pode ocorrer através de mecanismos dependentes de GMPc (AY et al., 2006; BLATTES e WIER, 1994; ROBERTSON et al., 1993) ou independentes de GMPc, por hiperpolarização da membrana por ativação de canais para K⁺ (CASTRO et al., 2011; TOQUE et al., 2010, FURCHGOTT, 1999; BOLOTINA et al., 1994).

Sendo a asma uma doença respiratória caracterizada pela hiperreatividade brônquica e pela redução do fluxo aéreo, a utilização de broncodilatadores é importante para o alívio dos sintomas por relaxarem o músculo liso das vias respiratórias (SOCIEDADE..., 2012). Portanto, este trabalho teve a intenção de contribuir para a discussão a respeito do mecanismo de ação do TERPY, um novo doador de NO, em músculo liso traqueal inflamado por tratamento com OVA, um modelo experimental semelhante à asma humana e comparando-os aos mecanismos em músculo liso traqueal de rato de grupo Sham. Os mecanismos de relaxamento do TERPY e SNP em traqueias de ratos saudáveis já foram apresentados e discutidos em trabalhos anteriores (CASTRO et al., 2011; CASTRO, 2011), portanto, esta discussão privilegiará os efeitos desses doadores de NO em modelo de músculo liso traqueal de rato tratado com OVA e sua comparação com os mecanismos observados nos ratos saudáveis, chamados de Sham.

O tratamento com OVA é o modelo clássico de indução de asma experimental em roedores. Ela é uma proteína purificada de ovos de galinha, usada extensivamente como alérgeno e é conhecida por causar asma ocupacional (ZOSKY e SLY, 2007; BOENIGER et al., 2001). A sensibilização com OVA, tanto no homem como em animais, leva à inflamação por recrutar células como eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos (ZOSKY e SLY, 2007), além da hiperreatividade brônquica que ocorre através da ligação antígeno-anticorpo produzindo IgE específicas e consequente liberação de agentes constritores pelos mastócitos como serotonina, leucotrienos e histamina (VOS et al., 2008; MAYR, ZUBERI e LIU, 2003; EUM et al., 1999). Essas características habilitam a OVA como agente imunogênico satisfatório para estudar processos inflamatório nas vias aéreas.

Os resultados histológicos da traqueia no presente trabalho demonstraram que, em comparação com o grupo Sham, que a OVA desencadeou um processo inflamatório mononuclear, aumento do número de mastócitos e remodelamento do tecido traqueal. Além desses achados histológicos houve aumento da reatividade do músculo liso nos experimentos com órgão isolado (reatividade traqueal) ao agonista colinérgico carbacol. Tais características demonstram que o modelo de sensibilização por OVA, chamada neste trabalho de asma experimental são semelhantes àquelas que têm sido descritas em pacientes com asma humana (GINA, 2014).

O TERPY tem seus efeitos descritos como vasodilatador em aorta de ratos saudáveis (BONAVENTURA et al., 2007), aorta de ratos hipertensos (BONAVENTURA et al., 2011; MUNHOZ et al., 2012), em artéria mesentérica de ratos saudáveis e hipertensos (ARAÚJO et al., 2013), porém, não relaxou artéria basilar de ratos normotensos (PAULO et al., 2012). Seu efeito broncodilatador em traqueia de ratos saudáveis também já foi descrito (CASTRO et al., 2011). Entretanto, nenhuma pesquisa até então avaliou o efeito do TERPY em modelo experimental de asma.

Com este propósito, o primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar se o TERPY e o SNP seriam capazes de relaxar o músculo liso traqueal de ratos tratados com OVA, assim como se mostraram eficazes em músculo liso traqueal de animais saudáveis pré-contraídos com carbacol (CASTRO et al., 2011). Os resultados demonstraram que ambos os doadores de NO causaram relaxamento concentração-dependente em traqueias de ratos tratadas com OVA, sendo que o TERPY foi mais eficaz do que o SNP, porém menos potente, seja em animais do grupo Sham ou naqueles tratados com OVA. Outros estudos têm demonstrado essas diferenças entre TERPY e SNP em preparações de músculo liso vascular. Os estudos comparativos dos efeitos do TERPY e SNP em artéria aorta de ratos normotensos, espontaneamente hipertensos (SHR) e hipertensos pelo modelo 2R-1C demonstram que o TERPY é menos potente do que o SNP, porém, os dois doadores de NO conseguem levar ao relaxamento máximo (BONAVENTURA et al., 2007; BONAVENTURA et al., 2011; MUNHOZ et al., 2012). Outros compostos de

rutênio doadores de NO são menos potentes do que o SNP em aorta de ratos normotensos (RODRIGUES et al., 2011).

A presente pesquisa observou que o estado inflamatório do músculo liso traqueal em animais tratados com OVA não modificou os parâmetros farmacológicos de relaxamento para o TERPY em comparação com os animais do grupo Sham, pois a potência e a eficácia se mostraram semelhantes às aquelas observadas em traqueias de ratos do grupo Sham. O estudo comparativo do mecanismo de ação do TERPY em artérias mesentéricas de animais normotensos e hipertensos 2R-1C (ARAÚJO et al., 2013) não demonstrou variações significativas de potência e eficácia entre os diferentes grupos, assim como o estudo em artéria aorta de animais normotensos e SHR (MUNHOZ et al., 2012). Entretanto, Bonaventura et al. (2011), evidenciou que o TERPY apresentou redução de potência em artéria aorta de ratos hipertensos 2R-1C. Em sua maioria, os resultados do TERPY sugerem que seu efeito relaxante sobre o músculo liso não é modificado pela asma ou pela hipertensão arterial.

Os resultados do presente trabalho relacionados ao SNP, verificaram redução da eficácia do relaxamento nas traqueias dos ratos do grupo OVA em comparação com as do grupo Sham, evidenciando que o processo inflamatório pode diminuir o efeito relaxante do SNP. Outro estudo também demonstrou que o SNP tem seu efeito máximo reduzido em modelo de asma experimental em camundongos (INTAPAD et al., 2012). Estudos de vasorrelaxamento com SNP em animais 2R-1C não apresentam modificação de seu efeito máximo, porém, levou a redução de sua potência em comparação com animais Sham (BONAVENTURA et al., 2011); em ratos SHR, houve tanto redução da potência quanto da eficácia em comparação com o saudáveis (MUNHOZ et al., 2012). Assim, pode-se sugerir que tanto a asma quanto a hipertensão arterial podem levar a modificações negativas do efeito no SNP.

O TERPY parece ser mais eficaz em produzir um efeito relaxante sobre traqueias do que o SNP em modelo experimental de asma, já que seus efeitos não são reduzidos pelo processo inflamatório, como ocorre com o SNP.

Para identificação dos mecanismos pelos quais os TERPY e o SNP são capazes de relaxar o músculo liso traqueal, diversas ferramentas farmacológicas foram utilizadas no presente trabalho.

A ativação da GCs em músculo liso traqueal induz à geração de GMPc com consequente fosforilação da proteína quinase G (PKG) e mudança na atividade das proteínas efetoras como as fosfodiesterases, aos canais iônicos e às bombas de íons, tendo como consequência a broncodilatação (FRANCIS et al., 2010; ELLIS, 1997). Em modelo murino de asma alérgica, tanto os níveis de GCs quanto seu RNAm foram reduzidos nos pulmões de camundongos tratados com o inibidor seletivo da GCs (ODQ) e apresentaram aumento da reatividade das vias aéreas à metacolina em comparação com os camundongos Sham (PAPAPETROPOULOS et al., 2006). Estes resultados sugerem que a GCs pode estar inibida em pacientes com asma, levando à hiperreatividade brônquica característica. Observa-se ainda que em pacientes com asma, a broncodilatação fica reduzida, mesmo na presença de grandes quantidades de NO nas vias aéreas que poderiam ativar a GCs e causar o relaxamento do músculo liso (DUPONT et al., 2014). Diante desses achados, o presente trabalho verificou a participação da via da NO/GCs/GMPc e a influência das PDEs no relaxamento do TERPY e do SNP em traqueias de ratos do grupo OVA.

Os resultados do SNP em presença de ODQ, um inibidor da GCs, sugerem o envolvimento do GMPc no relaxamento das traqueias de ratos do grupo Sham porque a presença deste inibidor reduziu sua potência e sua eficácia. As traqueias de ratos do grupo OVA o ODQ levou apenas a redução da potência do SNP. Comparando esses dados, pode-se sugerir que houve redução da participação do GMPc no relaxamento do músculo liso de traqueias inflamadas. Estes dados corroboram com os achados de Papapetropoulos et al (2006), que demonstraram uma redução de 50 a 80 % da expressão de RNAm para a GCs na asma. Estímulos inflamatórios presentes na asma, como lipopolissacarídeos, IL-1 ou misturas de citocinas levam a redução nos níveis de RNAm para GCs (TAKATA et al., 2001; BOUSQUET et al., 2000; PAPAPETROPOULOS et al., 1996), o que pode estar diretamente ligado à redução dos níveis de GCs e consequente redução

do GMPc e seus efeitos. Uma redução da expressão de GCs pode levar a uma incapacidade de NO em agir como um broncodilatador eficaz em vias aéreas de ratos do grupo OVA. Podendo esta ser a possível explicação para os achados do SNP em presença do ODQ em traqueias de ratos deste grupo.

A inibição da GCs não alterou os parâmetros farmacológicos avaliados do TERPY em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham, porém, levou à redução da potência do músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA. O relaxamento provocado pelo NO também pode ocorrer por mecanismos independentes de GMPc (BOLOTINA et al., 1994) e esta parece ser a principal via pela qual o TERPY leva ao relaxamento em traqueias saudáveis (CASTRO et al., 2011), assim como outros compostos doadores de NO derivados de rutênio, que também demonstram pouca dependência de GMPc (PEREIRA et al., 2013). O processo inflamatório característico da asma leva a uma maior produção e liberação de NO já que há maior expressão da iNOS no epitélio e nas células inflamatórias (PARLAK et al., 2012; KHARITONOV e BARNES, 2001; SALEH et al., 1998; KHARITONOV et al., 1994). Assim, supõe-se que o aumento da biodisponibilidade do NO na asma associado ao TERPY, que apresenta liberação de NO espontaneamente (de LIMA et al., 2006), pode ser grande o suficiente para ativar a GCs e levar ao aumento do GMPc e conseqüentemente, favorecendo o efeito relaxante do TERPY. Portanto, no grupo OVA, parece haver participação da via NO/GCs/GMPc no mecanismo de relaxamento do TERPY, ausente no grupo Sham.

Os resultados com o inibidor não seletivo das PDEs, IBMX, fortalecem a suposição de que a via NO/GCs/GMPc participa do relaxamento induzido pelo SNP tanto em traqueia de ratos do grupo Sham quanto naquelas do grupo OVA. Com a redução da degradação dos nucleotídeos cíclicos como o GMPc promovida pelo IBMX, inibidor não seletivo de PDE) esperava-se um aumento da eficácia do SNP, o que foi observado em ambos os grupos, entretanto, como maior magnitude no grupo OVA.

As curvas de relaxamento do TERPY mostraram-se deslocadas para a esquerda em presença do IBMX, evidenciando um aumento de sua

potência quando houve inibição da degradação dos nucleotídeos cíclicos, tanto para o grupo Sham quanto para o grupo OVA.

Vários estudos demonstraram que as isoformas PDE 3, PDE 4 e PDE 5 estão presentes no músculo liso respiratório (RABE, MAGNUSSEN e DENT, 1995; BARNES, 1995) e que a inibição destas pode levar ao relaxamento do músculo liso traqueal de ratos e cobaias e brônquios humanos (LIU et al., 2008; MATSUDA et al., 2000; CORTIJO, VILLAGRASA e PONS, 1999; TANAKA et al., 1991). A utilização dos inibidores de PDE para o tratamento de doenças inflamatórias das vias respiratórias é bastante difundida. Sua utilização na prática clínica ocorre há mais de 80 anos devido ao seu efeito profilático nas crises de asma e em um breve futuro, a utilização em baixas doses de inibidores de PDEs para reverter a resistência a corticoides na asma severa e na doença pulmonar obstrutiva crônica pode ser uma alternativa terapêutica (BARNES, 2013; BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; BANNER e PAGE, 1995; FALLIERS e KATSAMPES, 1976).

A inibição da PDE3 como broncodilatador e broncoprotetor em ratos e humanos idosos asmáticos foi demonstrada, assim como suposições de que a amrinona, um inibidor seletivo de PDE 3, poderia ser benéfica para o tratamento de pacientes com asma (MATSUDA et al., 2000; FUJIMURA et al., 1997). A PDE4 é a principal PDE presente em leucócitos e sua inibição tem sido associada a efeitos anti-inflamatórios, assim como a redução da hiperreatividade brônquica, podendo ser utilizado como antiasmático (KOBAYASHI et al., 2012; DASTIDAR et al., 2009; HOWELL, SICKELS, WOEPPEL, 1993). Fármacos inibidores da PDE 5 são conhecidos por serem potentes vaso e broncodilatadores e são habitualmente utilizados na prática clínica para o tratamento da disfunção erétil e hipertensão pulmonar por potencializarem os efeitos do NO (PARK et al., 2014; IACOVIDOU et al., 2012).

Como os resultados deste trabalho evidenciaram a participação da via NO/GCs/GMPc no relaxamento dos doadores de NO, seja em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham ou tratado com OVA e dados da literatura mostram que os efeitos benéficos da inibição das PDE na asma ocorrem, em grande parte pela maior disponibilidade dos nucleotídeos cíclicos como AMPc

e GMPc (ELLIS e CONANAN, 1995), decidiu-se investigar a participação dessas três isoformas de PDE no relaxamento do SNP e do TERPY tanto em músculo liso de traqueias de ratos do grupo Sham quanto no grupo tratado com OVA.

Em traqueias de ratos do grupo Sham, observou-se que o SNP teve seu efeito relaxante aumentado quando ocorreu a inibição seletiva das PDEs 4 e 5. Já nas traqueias de ratos do grupo OVA, além destas, verificou-se também a participação da PDE3, corroborando com os dados da literatura apresentados e sugerindo que a principal via de relaxamento do SNP se dá através da formação do segundo mensageiro GMPc. Portanto, a inibição das PDEs 3, 4 ou 5 melhoram a ação relaxante do SNP em músculo liso de traqueias de ratos tratados com OVA.

Quanto ao TERPY, em animais Sham, apenas a inibição da PDE 4 demonstrou melhora da potência da droga. Entretanto, nas traqueias inflamadas não foi verificada melhora do efeito relaxante do TERPY quando houve a inibição seletiva das PDEs. Pode-se supor que o aumento do efeito relaxante do TERPY não ocorre apenas pela inibição de uma única isoforma de PDE, mas de um conjunto delas. Neste caso, para haver potencialização do efeito relaxante do TERPY tanto em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham como nos tratados com OVA, necessita-se de um inibidor de PDE não seletivo. Ou ainda, pode-se inferir que outras isoformas de PDE diferentes da 3, 4 e 5 possam ser importantes para o efeito relaxante do TERPY nas vias aéreas.

Os canais para K^+ têm uma importante participação no relaxamento do músculo liso traqueal. A abertura destes canais leva a hiperpolarização da célula muscular lisa com conseqüente fechamento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Isto leva a redução da concentração intracelular de cálcio resultando no relaxamento das fibras musculares (JONES et al., 1990; ALLEN et al., 1986) inclusive de vias aéreas normais ou inflamadas (GAO et al., 2013).

Neste trabalho, a participação dos canais para K^+ foi estudada a partir do seu bloqueio não seletivo provocado pelo Tetraetilamônio (TEA) e dos bloqueadores seletivos para os diferentes canais.

O efeito relaxante do TERPY na presença do TEA foi reduzido tanto nas traqueias de ratos do grupo Sham como naquelas do grupo OVA, evidenciando a participação dos canais para K^+ no mecanismo de relaxamento deste doador de NO. Em ambos os grupos, o TEA reduziu a eficácia do TERPY, sugerindo que o processo inflamatório provocado pelo modelo experimental de asma não modifica a participação dos canais para K^+ no relaxamento deste doador de NO. Este é um importante achado a respeito do mecanismo do TERPY em traqueias de ratos do grupo OVA, pois quando foi testado em um estudo comparativo em aorta de ratos normotensos e hipertenso 2R-1C, verificou-se que a hipertensão levou a falha na ativação destes canais. Assim, os canais para K^+ que participavam do mecanismo de relaxamento para ratos normotensos passaram a não participar do mecanismo de ação do TERPY em artérias de ratos hipertensos (BONAVENTURA et al., 2011).

Dados da literatura apontam que o NO pode relaxar o músculo liso através da ativação dos canais para K^+ e esta ativação pode ocorrer por mecanismos dependentes (WU et al., 2004; NAKAHARA et al., 2000) ou independentes de GMPc (BOLOTINA et al., 1994). Para o TERPY, observa-se que em músculos lisos vasculares de ratos normotensos ou hipertensos, a ativação dos canais para K^+ ocorre através das ações de nucleotídeos cíclicos como o GMPc (ARAÚJO et al., 2013; MUNHOZ et al., 2012; BONAVENTURA et al., 2011; BONAVENTURA et al., 2007). Em traqueias de ratos do grupo OVA, os resultados deste trabalho sugerem que a via NO/GCs/GMPc pode estar participando do relaxamento provocado pelo TERPY. Entretanto, em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham, a hiperpolarização ocorre por mecanismos independentes de GMPc (CASTRO, et al., 2011).

A participação dos canais para K^+ no relaxamento do SNP apresentou-se diferente do esperado, pois o bloqueio destes canais pelo TEA levou ao aumento da sua eficácia para os dois grupos estudados. Dados da literatura demonstraram que o TEA, além de bloquear canais para K^+ , pode levar à direta ativação das junções Gap em diferentes tecidos incluindo traqueias (CASTRO et al., 2011; WATTS et al., 1994; KANNAN e DANIEL, 1978). Para Kannan e Daniel (1978), o TEA em traqueia de cães pode

aumentar o espaço juncional entre as membranas das células musculares lisas, elevando o tamanho das junções Gap. Como consequência, ligaria diretamente a região citoplasmática de duas células vizinhas permitindo a passagem de metabólitos, íons, segundos mensageiros, Ca^{2+} , entre outras moléculas $\leq 1\text{kDa}$ (LAMPE e LAU, 2004; KUMAR e GILULA, 1996), resultando em aumento de múltiplas respostas celulares. Outros estudos sugerem que o próprio NO é capaz de aumentar a permeabilidade dessas junções em tecido cardíaco de ratos através da cascata GCs/GMPc/PKG através da ativação da fosforilação das proteínas que formam as junções, as conexinas (GÖNCZI et al., 2009; PATEL et al., 2006). Diante dessas evidências e do estudo do SNP em traqueias de ratos saudáveis (CASTRO et al., 2011), sugerimos que os mecanismos descritos anteriormente podem estar ocorrendo também em músculo liso traqueal de rato do grupo OVA, facilitando a passagem do NO e/ou dos segundos mensageiros por ele gerados para as camadas de células mais profundas, promovendo a abertura das junções Gap. Essa resposta ocorreu apenas para o SNP, pois a via GCs/GMPc/PKG parece ser ativada principalmente por este doador de NO.

Um dos principais mecanismos de relaxamento do músculo liso se dá através da abertura/ativação dos canais para K^+ . É conhecido que a ativação dos canais para K^+ leva ao efluxo de íon K^+ e consequente hiperpolarização da membrana do músculo liso, culminando no fechamento dos canais de cálcio operados por voltagem. Esse mecanismo de ativação dos canais de K^+ é induzido pelo NO e pode ocorrer dependente (COELHO et al., 2008; KANN e JOHNSON, 1993) ou independente da ação dos nucleotídeos cíclicos, como o GMPc (BOLOTINA et al., 1994).

A participação dos diferentes tipos de canais para K^+ como K_{IR} (retificador), K_{ATP} (dependentes de ATP intracelular), K_{V} (dependentes de voltagem), K_{Ca} (canais ativados por Ca^{2+}) e SK_{Ca} (canais ativados por Ca^{2+} de baixa condutância) foi avaliada e comparada em animais dos grupos Sham e OVA .

O relaxamento pelo SNP em traqueias de animais Sham mostrou-se ligado aos canais de K^+ do tipo K_{IR} , K_{V} e SK_{Ca} . Os canais K_{ir} são expressos no músculo liso e permitem o influxo e efluxo de K^+ à medida que há modificação do potencial de membrana, indicando que o canal K_{ir} tem

importante participação no equilíbrio entre os íons Ca^{2+} e K^+ em células epiteliais do sistema respiratório (NELSON e QUAYLE, 1995; MCCANN et al., 1990). Os canais K_v pertencem à superfamília dos canais iônicos dependentes de voltagem e regulam o potencial de membrana em resposta à despolarização do músculo liso. O tratamento com 4-AP, o inibidor seletivo deste canal, melhorou o perfil de relaxamento do SNP e a possível explicação para esse achado está em dados da literatura que sugerem o aumento da abertura das junções Gap, assim como ocorre com o TEA, levando ao aumento do espaço juncional entre membranas de células musculares lisas (CASTRO et al., 2011; KANNAN e DANIEL, 1978). Os SK_{Ca} respondem a alterações da concentração de cálcio intracelular regulando o potencial de membrana e possuem propriedades dependentes do complexo Ca^{2+} -calmodulina (STANDEN e QUAYLE, 1998; NELSON e QUAYLE, 1995).

O relaxamento pelo SNP em animais do grupo OVA apresentou algumas diferenças quando comparado ao relaxamento das traqueias dos animais Sham. Observou-se que os canais K_{IR} parecem ter sido dessensibilizados pela inflamação e que o clotrimazol parecem ter sua participação semelhante a do TEA e do 4-AP por terem melhorado o perfil de relaxamento do SNP. A participação dos canais de K_v e SK_{Ca} , foram semelhantes entre os grupos Sham e OVA, aumentando o relaxamento induzido pelo SNP.

Os resultados do presente trabalho para o SNP reafirmam os estudos de Gao et al (2003), que demonstraram que os canais K_v e SK_{Ca} podem ser responsáveis pelo relaxamento do SNP em células de músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA. Dados da literatura demonstraram a participação dos canais K_v e K_{Ca} na hiperresponsividade brônquica na asma, assim como a sua utilização como alvo terapêutico para asma em ratos, ovelhas e humanos (GIRODET et al., 2013; VAN DER VELDEN, SUM, BARKER, 2013; BRADDING e WULFF, 2009; PELAIA et al., 2002).

Diante dos resultados com ODQ, TEA, IBMX e com dos inibidores/bloqueadores seletivos de PDEs e de canais de K^+ para o relaxamento do SNP em músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA, sugere-se a participação do GMPc como segundo mensageiro intracelular do SNP e

que este e/ou a PKG possam ser os ativadores dos canais para K^+ levando ao relaxamento traqueal por hiperpolarização celular.

O relaxamento do TERPY em traqueias de ratos do grupo OVA apresentou importantes diferenças quando comparado ao relaxamento das traqueias dos ratos do grupo Sham em presença dos bloqueadores seletivos de canais de K^+ . Verificou-se que o relaxamento do músculo liso de traqueias de de ratos do grupo Sham dependia dos canais K_{IR} , K_V e K_{ATP} e estes dados corroboram com dados da literatura que indicam a participação destes canais no relaxamento do músculo liso traqueal (CASTRO, 2011; LIN et al., 2006; BONAVENTURA et al., 2006). Já no relaxamento do TERPY em músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA não foi identificada nenhuma participação dos canais para K^+ quando testados isoladamente. Sugerindo que, ou o processo inflamatório pode ter alterado o mecanismo de ação do TERPY de forma que os canais para K^+ passaram a não participar dos eventos intracelulares que levam ao relaxamento, ou que o bloqueio de apenas um tipo de canal não seja suficiente para interferir na resposta relaxante total, ou ainda, as duas situações podem ter ocorrido.

O retículo sarcoplasmático é considerado um dos principais estoques intracelulares de Ca^{2+} . A concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) é responsável por determinar o tônus do músculo liso traqueal (JANSSEN et al., 2001) e diversos estudos demonstraram que o armazenamento de Ca^{2+} pela Ca^{2+} -ATPase reticular (SERCA - que pode ser inibida pelo ácido ciclopiazônico-CPA) está envolvida no relaxamento do músculo liso pelo NO (BAZÁN-PERKINS, SÁNCHEZ-GUERRERO, CAMPOS, 2009; SIMS, JIAO, ZHENG, 1996). Os resultados do presente estudo, demonstraram participação variada da SERCA no relaxamento do TERPY e do SNP.

Para o SNP, observou-se que a inibição da SERCA pelo CPA modificou os parâmetros farmacológicos de potência e eficácia em músculo liso de traqueia de ratos do grupo Sham, demonstrando que o efeito relaxante do SNP pode ocorrer devido à redução da $[Ca^{2+}]_i$ mediada pela SERCA. Entretanto, em traqueia de ratos do grupo OVA a presença do CPA não modificou o relaxamento do SNP, sugerindo que o estado inflamatório pode ter dessensibilizado a Ca^{2+} -ATPase reticular ou que a quantidade de GMPc e PKG formados não sejam suficientes para ativá-la. Resultados semelhantes

a estes foram encontrados em artérias isoladas por Bonaventura et al. (2007; 2011), em que a bomba de Ca^{2+} mostrou-se importante para o relaxamento do SNP em ratos normotensos, porém, em ratos hipertensos (2R-1C), o relaxamento induzido pelo SNP não foi alterado pela presença do CPA, sugerindo que a ativação da SERCA não contribui para o mecanismo de relaxamento induzido pelo SNP em aortas de ratos 2R-1C.

Dados da literatura demonstram a participação da SERCA no relaxamento do SNP tanto em artérias quanto em traqueias isoladas, e evidenciam que a ativação da bomba de Ca^{2+} reticular ocorre através da proteína quinase G (PKG), que por sua vez, é ativada pelo GMPc, evidenciando mais uma vez a participação da via da GCs/GMPc/PKG no relaxamento do SNP (BONAVENTURA et al., 2011; CASTRO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011, LUNARDI et al., 2006). Entretanto, os resultados desse trabalho sugerem uma redução dessa via em traqueias de ratos do grupo OVA, podendo-se supor que a não participação da SERCA no relaxamento deste grupo possa decorrer da produção insuficiente de PKG e, conseqüentemente, não ativação da Ca^{2+} -ATPase reticular, resultando na diminuição do efeito relaxante do SNP.

Diferentemente do observado para o SNP, o TERPY não teve sua potência ou eficácia modificada pelo CPA em traqueias de animais Sham, porém apresentou redução de sua potência em traqueias de animais do grupo OVA. Os resultados do TERPY em músculo liso de traqueia de ratos do grupo Sham sugerem que o efeito desse composto não é dependente da Ca^{2+} -ATPase reticular e esses dados corroboram com estudos que indicam que o armazenamento de Ca^{2+} por essa bomba parece não estar envolvido na redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em músculo liso das vias aéreas (ROUX e MARHL, 2004), inclusive para o mecanismo de ação do próprio TERPY em outros tipos de músculo liso como o vascular de ratos normotensos e hipertensos (MUNHOZ et al., 2012; BONAVENTURA et al., 2011; BONAVENTURA et al., 2007).

Entretanto, os resultados deste trabalho para o TERPY sugerem que em músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA a via GCs/GMPc/PKG pode estar participando do seu efeito relaxante, pois a ativação da GCs pode levar a aumentos subsequentes de GMPc e PKG. Portanto, a PKG poderia

atuar sobre a SERCA e reduzir a $[Ca^{2+}]_i$ favorecendo o relaxamento do TERPY em músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA.

A ação relaxante do NO sobre o músculo liso traqueal pode ocorrer por diversas vias que inibem o influxo de Ca^{2+} pela membrana plasmática e esses mecanismos podem ocorrer dependentes de GMPc (AY et al., 2006; BLATTER e WIER, 1994; ROBERTSON et al., 1993), por hiperpolarização da membrana através de mecanismos independentes de GMPc como ativação de canais de K^+ (TOQUE et al., 2010; BOLOTINA et al., 1994) e pela inibição direta dos canais de cálcio (GE et al., 2013; CATALI, ZHANG e JANSSEN, 2002).

Para tentar elucidar a participação dos diferentes canais de cálcio no relaxamento do SNP e do TERPY, realizou-se as curvas de contração para o cálcio incubadas com SNP ou TERPY em presença de solução de KCl 75 mM com o objetivo de verificar a participação do influxo de cálcio por canais de cálcio operados por voltagem ou também denominado de canal do tipo L (VOCC, do inglês *voltage operated calcium channels*) ou em presença do agonista colinérgico carbacol para verificar a participação dos canais VOCC e dos canais de cálcio operados por estoque (SOCC, do inglês *store operated calcium channels*), pois o estoque intracelular de cálcio mediado pelo retículo sarcoplasmático foi depletado com estimulações sucessivas de carbacol em solução de Krebs sem cálcio (FLORES-SOTO et al., 2013; SOMLYO e SOMLYO, 1994).

A concentração de KCl 75 mM na região extracelular leva à inativação dos canais para K^+ e acúmulo de íons K^+ no interior da célula muscular, levando à despolarização da membrana e consequente abertura dos VOCC (NELSON e QUAYLE, 1995). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ tem como resultado a contração da fibra muscular independentemente da ativação de receptores de membrana.

Os resultados da curva de contração para cálcio incubadas com SNP ou TERPY demonstraram redução significativa da contração das fibras musculares tanto para as traqueias de ratos tratadas com OVA como para as do grupo Sham, indicando que ambos os doadores de NO podem levar ao bloqueio dos canais VOCC independentes do estado inflamatório do músculo liso traqueal, já que concentrações elevadas de K^+ no líquido extracelular

levam à abertura desse tipo de canal de Ca^{2+} . Dados da literatura têm mostrado que o relaxamento do músculo liso traqueal de cães, porcos e cobaias podem ocorrer através da inibição direta dos canais de cálcio operados por voltagem, independentemente da ativação dos canais para K^+ (GE et al., 2013; CATALI, ZHANG, JANSSEN, 2002). Baseados nesses achados e nos resultados do presente trabalho sugere-se que o SNP e o TERPY podem levar ao relaxamento o músculo liso traqueal possivelmente por alterar a mobilização ou sensibilidade ao Ca^{2+} extracelular através da inibição do influxo de cálcio pelos VOCC.

A participação dos SOCC e do VOCC foi estudada através da ação agonista do carbacol ao receptor muscarínico M_3 na membrana do músculo liso traqueal. Esta ação leva a ativação da fosfolipase C (PLC) através da proteína G acoplada ao receptor. A PLC catalisa a formação dos segundos mensageiros IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato) e DAG (diacilglicerol). O IP_3 interage com o receptor de IP_3 da membrana do retículo sarcoplasmático e estimula a liberação dos estoques de cálcio, levando ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (FLORES-SOTO et al., 2013). A diminuição da concentração de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático ativa os SOCC da membrana sarcoplasmática permitindo o influxo de Ca^{2+} e Na^+ (despolarização da célula muscular) e levando à contração muscular sustentada. Além disso, o DAG ativa PKG e esta fosforila canais de cálcio da membrana como os VOCC. Assim, a despolarização mediada pelo DAG leva a abertura do VOCCs permitindo o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e consequente contração muscular em resposta ao agonista do carbacol (FLORES-SOTO et al., 2013). Entretanto, nos experimentos de contração para o cálcio, estes mecanismos estavam inibidos, pois a solução de Krebs utilizada não apresentava cálcio em sua composição. À medida que as concentrações sucessivas de cálcio iam sendo adicionadas, esta via de contração passou a ser ativada. Assim, a incubação com SNP ou TERPY em presença do agonista colinérgico carbacol permitiu avaliar participação dos SOCC e dos VOCC.

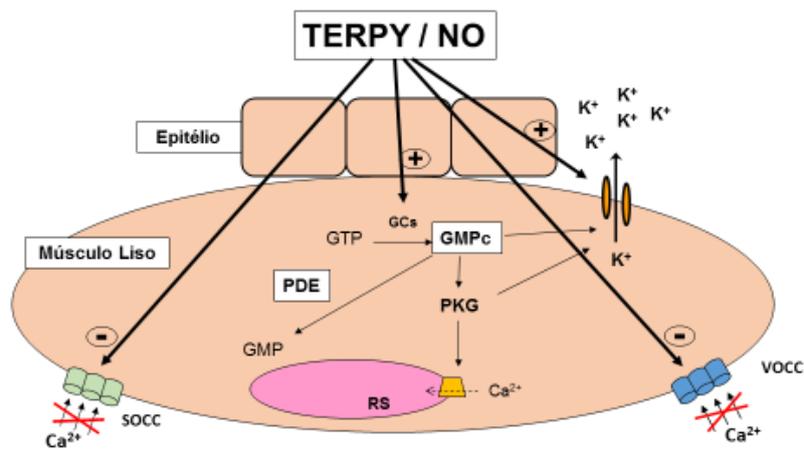
Os resultados das curvas de contração de cálcio mediada pelo carbacol indicaram uma intensa redução da contração do músculo liso traqueal de ratos dos dois grupos testados, tanto do SNP quanto do TERPY. Isso indica que ambos os doadores de NO podem estar bloqueando os canais

de cálcio ativados por agonista colinérgico como o SOCC e o VOCC. Os níveis de contração do músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham e do grupo tratados com OVA foram semelhantes para o SNP (Fig. 23), demonstrando que a participação deste canal é semelhante em ambos os grupos experimentais. Entretanto, o TERPY apresentou diferença entre os grupos. Observou-se que em traqueias de ratos do grupo OVA, mesmo em presença de carbacol, os sucessivos aumentos de cálcio não provocaram contração do músculo liso quando as traqueias foram incubadas com este doador. Isto sugere que os canais SOCC e VOCC têm maior importância no mecanismo de ação do TERPY em músculo liso inflamado. Este pode ser mais um mecanismo de ação do TERPY.

As vias aéreas de ratos sofrem contração na presença de agonistas colinérgicos e esse efeito pode variar de acordo com a local, sendo os bronquíolos mais responsivos do que as vias aéreas proximais (KOTT et al., 2002). Nossos resultados com bronquíolos (Fig. 28) demonstraram que o carbacol reduziu a luz bronquiolar e que o TERPY foi capaz de reverter parcialmente essa contração. Este protocolo experimental foi realizado apenas no grupo OVA e em resposta ao TERPY devido a extrema dificuldade de realização do mesmo.

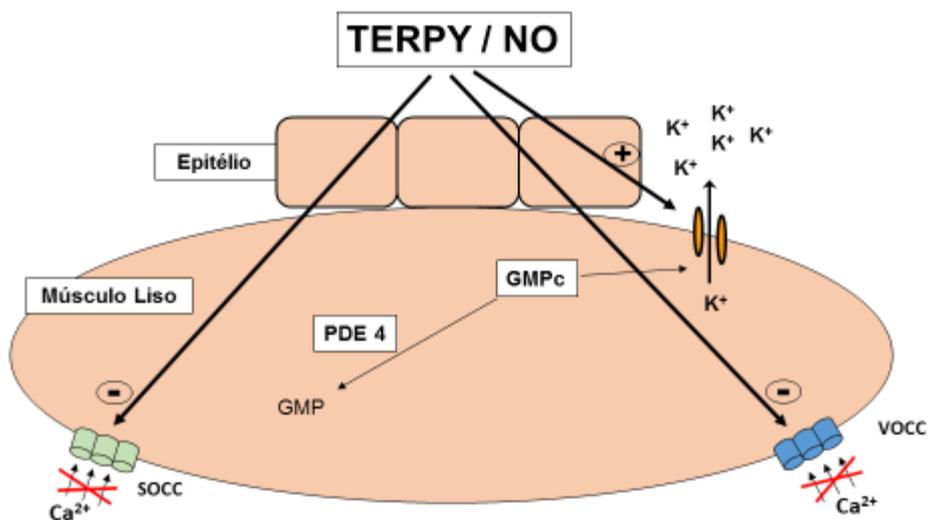
Avaliando todas as ferramentas farmacológicas utilizadas neste trabalho para elucidar o mecanismo de ação do TERPY em traqueias de ratos do grupo OVA, pode-se sugerir que seu efeito relaxante ocorre através da ativação da via NO/GCs/GMP, ativação de canais para K^+ e redução do influxo de cálcio por bloqueio dos VOCC e SOCC (Fig. 29). Assim, o mecanismo do TERPY em músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA apresenta-se diferente do mecanismo em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham. Em traqueias de ratos do grupo Sham, o TERPY leva ao relaxamento por ativação dos canais de K^+ independentes de GMPc e por redução do influxo de cálcio por bloqueio dos canais SOCC e VOCC (Fig. 30).

Figura 29: Mecanismo de ação do TERPY em traqueias de ratos do grupo OVA.



Fonte: autoria própria.

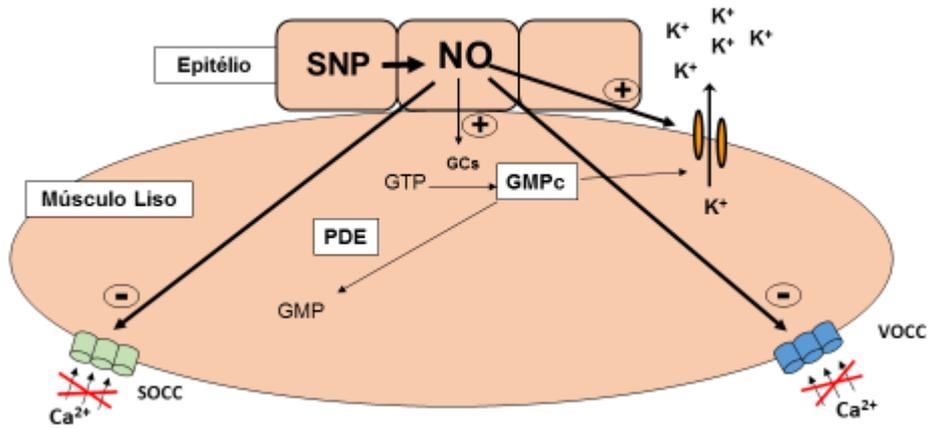
Figura 30: Mecanismo de ação do TERPY em traqueias de ratos do grupo Sham.



Fonte: autoria própria.

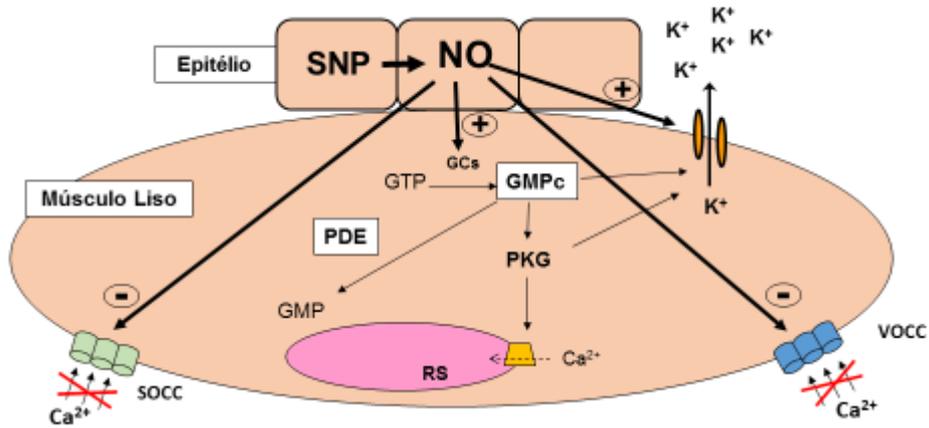
As ferramentas farmacológicas utilizadas para avaliar o mecanismo de ação do SNP em músculo liso de traqueias de ratos do grupo OVA sugerem que o relaxamento ocorre através da ativação da via NO/GCs/GMPc, ativação dos canais K_v , K_{Ca} e SK_{Ca} e por redução do influxo de cálcio por bloqueio dos canais SOCC e VOCC (Fig. 31). Entretanto, a ativação da enzima GCs parece estar reduzida em músculo liso inflamado, assim como o papel da SERCA, podendo ser esta a razão que explica o menor efeito relaxante do SNP em traqueias de ratos do grupo Sham quando comparada a traqueias de ratos do grupo OVA (Fig. 32).

Figura 31: Mecanismo de ação do SNP em traqueias do grupo OVA.



Fonte: autoria própria.

Figura 32: Mecanismo de ação do SNP em traqueias do grupo Sham.



Fonte: autoria própria.

Por fim, os mecanismos de relaxamento do TERPY e do SNP em músculo liso traqueal de ratos do grupo OVA são parecidos, pois ambos são capazes de ativar a via NO/GCs/GMPc e bloquear os canais SOCC e VOCC. A maior diferença entre os dois mecanismos está no fato dos canais para K^+ participarem de forma seletiva da ação do SNP. Entretanto, a ação específica destes canais não é suficiente para fazer o SNP relaxar o músculo liso inflamado com igual eficácia que o TERPY apresenta. Por isso, o TERPY se

mostra mais eficaz do que o doador de NO padrão, o SNP, em relaxar o músculo liso traqueal de ratos inflamados.

5.2 MECANISMOS INFLAMATÓRIOS E OXIDATIVOS

A asma é uma doença respiratória inflamatória e a presença de prostanóides derivados do ácido araquidônico via ciclooxigenase (COX) levam a contração do músculo liso, migração de eosinófilos e edema. Esses efeitos são tão importantes que umas das principais formas de tratamento da asma na atualidade é a utilização de anti-inflamatórios esteroidais (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; GOLAN, 2009). A participação dessas substâncias em traqueias de ratos do grupo OVA poderia alterar os mecanismos de relaxamento dos dois doadores de NO, já que estudos têm mostrado que prostaglandinas podem modular o tônus das vias aéreas (de SOUSA et al., 2010; SCHAAFSMA et al., 2007; BALZARY e COCKS, 2006).

Os resultados com o diclofenaco de sódio, um inibidor não seletivo da COX, mostraram que em traqueias de ratos do grupo Sham, não houve modificação da eficácia tanto para o relaxamento do SNP quanto do TERPY, o que era esperado e verificado em estudos anteriores (CASTRO et al., 2011; TOQUE et al., 2010; MARQUES, SANTO NETO e MEIRELLES, 1998). Assim, esses dados indicam que os derivados do ácido araquidônico metabolizados via COX não interferem no relaxamento do músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham induzido por ambos os doadores de NO.

A sensibilização e o desafio com OVA em animais é capaz de ativar resposta inflamatória com liberação de prostanóides broncoconstritores como Tromboxana A₂, Prostaglandina D₂, E₂ e F_{2α} nas vias respiratórias de roedores. Assim, a presença de um inibidor da COX como o diclofenaco possibilita a redução da broncoconstrição causada por esses mediadores inflamatórios (SELG et al., 2008). Corroborando com estes dados, os resultados do presente trabalho evidenciaram que o tratamento das traqueias de ratos do grupo OVA com o diclofenaco melhorou o perfil de relaxamento tanto do SNP quanto do TERPY, indicando que a inibição da COX reduziu a

formação de prostanóides pró-inflamatórios, favorecendo o relaxamento traqueal.

Além das prostaglandinas, os leucotrienos estimulam a migração de eosinófilos e o extravasamento vascular. A via de produção desses compostos ocorre através das lipoxigenases, gerando os cisteinil leucotrienos, principalmente o D₄. Estes leucotrienos se ligam aos seus receptores no músculo liso traqueal, o chamado CysLT₁, e desencadeiam a contração muscular lisa. Por isso, este tem sido um dos alvos terapêuticos para o tratamento da asma, os chamados antileucotrienos ou antagonistas dos receptores de leucotrienos CysLT₁ (BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN, 2012; GOLAN, 2009; BORGES, 2001).

Para investigar a participação da via dos leucotrienos, foi avaliado o efeito relaxante do SNP e do TERPY na presença do montelukaste, um antagonista CysLT₁, tanto em traqueias de ratos do grupo OVA como naquelas do grupo Sham. A presença do montelukaste modificou a eficácia do TERPY apenas em traqueias de ratos do grupo OVA, aumentando-a. Para o SNP, a presença do antagonista de CysLT₁ melhorou a o efeito relaxante máximo em ambos os grupos. O montelukaste não inibe a formação de NO em pulmões de ratos desafiados com lipopolissacarídeos (metodologia semelhante ao desafio com OVA) e seu mecanismo leva ao relaxamento brônquico e a redução dos efeitos inflamatórios similarmente à asma humana (HAMACHER et al., 2007).

Os resultados com o diclofenaco e com o montelukaste demonstram que os prostanóides e os leucotrienos característicos da asma podem modular negativamente o relaxamento do SNP e do TERPY. Assim, sugere-se que a associação de doadores de NO com anti-inflamatórios ou antileucotrienos pode ser benéfica para a reversão da broncoconstrição.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produzidas no organismo habitualmente e tem alto poder destrutivo, porém, são neutralizadas por agentes antioxidantes. O estresse oxidativo é o desbalanço entre agentes oxidantes e antioxidantes, e se encontra elevado nas doenças respiratórias como a asma. São grandes os danos causados pelos radicais livres na asma, exacerbando o processo inflamatório através da

ativação das células inflamatórias (leucócitos, macrófagos e mastócitos) que liberam mediadores que provocam broncoespasmo e edema (CALHOUN et al., 1992; KANAZAWA et al., 1991; DOELMAN e BAST, 1990).

Os níveis de NO encontram-se aumentados na asma, pois o processo inflamatório leva a ativação da iNOS (HAMID et al., 1993) consequente formação de RNS como NO^- e NO^+ (RICCIARDOLO et al., 2004) e esses radicais modulando tanto a função pulmonar como a patogenia de algumas doenças pulmonares (BARNES e BELVISI, 1993). Além disso, o NO tem sido detectado no ar exalado e servido para o diagnóstico de algumas formas de asma e de outras doenças respiratórias (RICCIARDOLO, SORBELLO e CIPRANDI, 2015; ROBERT et al., 2008; ALVING, WEITZBERG e LUNDBERG, 1993). Também por causa do processo inflamatório, há um aumento considerável das ROS, especialmente íons superóxido (O_2^-). Portanto, estes dois compostos altamente reativos se oxidam formando nitrito (NO_2^-) e outros radicais livres capazes de causar dano celular (ZUO, KOOZECHIAN e CHEN, 2014; COMHAIR e ERZURUM 2002).

Diante desses achados, o presente estudo avaliou o mecanismo de relaxamento do músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham e do grupo tratado com OVA para ambos os doadores de NO na presença do sequestrador de íons superóxido, o TIRON. Como esperado, foi observado melhora no perfil de relaxamento para os dois doadores de NO em traqueias de ratos do grupo OVA, sugerindo que agentes antioxidantes podem melhorar o relaxamento do músculo liso inflamado.

Esses resultados corroboram aos achados de Bonaventura et al. (2009), que verificaram que o TIRON potencializou o relaxamento do TERPY em aortas com epitélio intacto de ratos normotensos e dos dados de Rodrigues et al. (2008), que verificaram que a presença de um antioxidante (vitamina C) potencializou o relaxamento do TERPY em anéis de aortas de ratos 2R-1C. Ainda, estudos recentes evidenciaram que o efeito relaxante em músculo liso de traqueia tratada com OVA de algumas plantas é decorrente também de seu efeito antioxidante (BEZERRA et al., 2013).

O estresse oxidativo tem um papel importante na agressão das células do trato respiratório e é chave para manter e propagar o processo inflamatório. Assim, a utilização de agentes antioxidantes associados a broncodilatadores como o TERPY e o SNP podem melhorar seu efeito e proporcionar melhor reversão da broncoconstrição.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que há diferenças nas respostas relaxantes em traquéias de ratos do grupo Sham e do grupo OVA em presença do TERPY ou do fármaco padrão, SNP.

- Tanto o SNP quanto o TERPY induziram relaxamento de forma concentração-dependente tanto em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham quanto no grupo tratado com OVA.

- O TERPY apresentou maior resposta relaxante do que o SNP tanto em músculo liso traqueal de ratos do grupo Sham quanto no grupo tratado com OVA, mostrando que o novo doador tem maior eficácia em produzir relaxamento em traqueia de rato que o SNP.

- O mecanismo de ação provável do TERPY em traqueias de ratos do grupo Sham é a ativação dos canais de K^+ do tipo K_v , K_{IR} , K_{Ca} e K_{ATP} , independentes da via NO/GCs/GMPc.

- Em de traqueias de ratos do grupo OVA, além da ativação dos canais de K^+ , há participação da via NO/GCs/GMPc no relaxamento do TERPY.

- O mecanismo de ação provável do SNP em traqueias de ratos do grupo Sham ocorre através da via NO/GCs/GMPc e ativação dos canais K_v , K_{IR} e SK_{Ca} .

- O mecanismo de ação provável do SNP em traqueias de ratos do grupo OVA ocorre através da via NO/GCs/GMPc e ativação dos canais K_v , K_{Ca} e SK_{Ca} .

- Em traqueia de ratos do grupo Sham, a inibição das PDE 4 e 5 melhoram o efeito do SNP e nas traqueias de ratos do grupo OVA, também há a participação da PDE 3.

- Em traqueia de ratos do grupo Sham, a inibição da PDE 4 melhora o efeito do TERPY.
- Em traqueia de ratos do grupo OVA, a inibição da seletiva das PDE 3, 4 e 5 não interfere no efeito do TERPY.
- O SNP e o TERPY reduzem o influxo de cálcio tanto em traqueia de rato do grupo Sham quanto em traqueia de ratos do grupo OVA por bloquearem os canais SOCC e VOCC.
- Os subprodutos do ácido araquidônico, os leucotrienos e ânion superóxido parecem não influenciar o relaxamento estimulado pelo SNP ou pelo TERPY em traqueias de ratos do grupo Sham.
- Em traqueias de ratos do grupo OVA a utilização de inibidores da COX, antileucotrienos e sequestrante de superóxido melhoram o efeito de ambos os doadores de NO.
- O TERPY é capaz de reverter a contração exercida pelo carbacol em bronquíolo de ratos do grupo OVA.

Em suma, os dois doadores de NO, SNP e TERPY têm seus mecanismos de relaxamento modificados pelo processo inflamatório. Entretanto, esta modificação não foi capaz de alterar os parâmetros farmacológicos de potência e eficácia do TERPY. Já o SNP, tem menor efeito relaxante em traqueias do grupo Sham e isso pode decorrer da menor participação da enzima GCs e da bomba de cálcio reticular.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, S. I.; BOYLE, J. P. COTIJO, J. et al. Electrical and mechanical effects of BRL34915 in guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 89, p. 395-405, 1986.
- ALVING, K.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.M. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. **Eur Respir J.**, v. 6, p. 1368–1370, 1993.
- ANDERSSON, F.; KJELLMAN, M.; FORSBERG, G. et al. Comparison of the cost-effectiveness of budesonide and sodium cromoglycate in the management of childhood asthma in everyday clinical practice. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 86, p. 537-544, 2001.
- ARAÚJO, A.V.; PEREIRA, A.C., GRANDO, M.D. et al. The new NO donor Terpy induces similar relaxation in mesenteric resistance arteries of renal hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**, v. 35, p. 47-53, 2013.
- ARNOLD, W.P.; LONGNECKER, D.E.; EPSTEIN, R.M. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. **Anesthesiology**, v. 61, n. 3, p. 254-260, 1984.
- ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S. et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.
- ASHUTOSH, K.; PHADKE, K.; JACKSON, J.F. et al. Use of nitric oxide inhalation in chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 55, p. 109-113, 2000.
- AY, B.; BINNAZ, A.Y.; IYANOYE, A. et al. Cyclic nucleotide regulation of store-operated Ca²⁺ influx in airway smooth muscle. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 290, p. L278–L283, 2006.
- BALZARY, R.W.; COCKS, T.M. Lipopolysaccharide Induces Epithelium- and Prostaglandin E₂-Dependent Relaxation of Mouse Isolated Trachea through Activation of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 317, p. 806–812, 2006
- BANNER, K. H.; PAGE, C. P. Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma. **Eur Respir J.**, v. 8, p. 996-1000, 1995.
- BARNES, P.J. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases and airway function. **Eur. Respir. J.**, v. 8, p. 457-462, 1995a.
- BARNES, P.J. Is asthma a nervous disease? **Chest**, v. 107, n. 3, p. 119S-125SS, 1995b.
- BARNES, P.J.; BELVISI, M.G. Nitric oxide and lung disease. **Thorax**, v. 48, p. 1034–1043, 1993.
- BARNES, P.J. Is asthma a nervous disease? The Parker B. Francis Lectureship. **Chest**, v. 107, p. 119–125, 1995.
- BARNES, P.J. Reactive oxygen species and airway inflammation. **Free Rad Biol Med.**, v. 9, p. 235-243, 1990.
- BARNES, P.J. Theophylline. **Am J Respir Crit Care**, v. 188, p. 901-906, 2013.

- BARRETO, M.L.; RIBEIRO-SILVA, R.DE C.; MALTA, D.C. et al. Prevalence of asthma symptoms among adolescents in Brazil: National Adolescent School-based Health Survey (PeNSE 2012). **Rev Bras Epidemiol.**, v. 17, n. 1, p. 106-115, 2014.
- BAST, A.; HAENEN, G.R.; DOELMAN, C.J. Oxidants and antioxidants: state of the art. **Am J Med.**, v. 91, p. 2S–13S, 1991.
- BATES, J.N.; BAKER, M.T.; GUERRA, R.JR. et al. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochem. Pharmacol.**, v. 11, p. S157-165, 1991.
- BAZÁN-PERKINS, B.; SÁNCHEZ-GUERRERO, E.; CAMPOS, M.G. Capacitative Ca²⁺ entry during Ca²⁺ undershoot in bovine airway smooth muscle. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 24, n. 3-4, p. 161-166, 2009.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.
- BEZERRA, G.P.; GÓIS, R.W.; DE BRITO, T.S. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **J Ethnopharmacol.**, v. 149, n. 1, p. 62-69, 2013.
- BLATTER, L.A.; WIER, W.G. Nitric oxide decreases [Ca²⁺]_i in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. **Cell Calcium**, v. 15, n. 2, p. 122-131, 1994.
- BOENIGER, M. F.; LUMMUS, Z. L.; BIAGINI, R. E. et al. Exposure to protein aeroallergens in egg processing facilities. **Appl. Occup. Environ. Hyg.**, v. 16, p. 660–670, 2001.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.
- BONAVENTURA, C.; FAGO, A.; HENKENS, R. et al. Critical redox and allosteric aspects of nitric oxide interactions with hemoglobin. **Antioxid Redox Signal.**, v. 6, n. 6, p. 979-991, 2004.
- BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R.G.; DA SILVA, R.S. et al. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K⁺ channels and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase. **Life Sciences**, v. 89, p. 595-602, 2011.
- BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R.G.; VERCESI, J.A. et al. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascul. Pharmacol.**, v. 46, n. 3, p. 215-222, 2007.
- BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J, et al. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 1366–1374, 2009.
- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; LUNARDI, C.N. et al. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4, p. 387-394, 2006.
- BORGES, W.G. Antileucotrienos. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 24, 2001.
- BOUSQUET, J.; JEFFERY, P., BUSSE, W. et al. Asthma from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 161, p. 1720 –1745, 2000.

BOVE, P.F.; VAN DER VLIET, A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 515–527, 2006.

BRADDING, P.; WULFF, H. The K⁺ channels K(Ca)_{3.1} and K(v)_{1.3} as novel targets for asthma therapy. **Br J Pharmacol.**, v. 157, n. 8, p. 1330-9, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Departamento de Informática do SUS - DATASUS. **Morbidade hospitalar do SUS**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miuf.def>> . Acesso em 26 de julho de 2014.

BRODSKY, S. V.; MORRISHOW, A. M.; DHARIA, N. et al. Glucose scavenging of nitric oxide. **The American Journal of Physiology—Renal Physiology**, vol. 280, n. 3, p. F480–F486, 2001.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B.C.(Org). **As Bases Farmacológicas da Terapeutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

BUCALA, R. ; TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. **Journal of Clinical Investigation.**, vol. 87, n. 2, p. 432–438, 1991.

CALHOUN, W.J.; REED, H.E.; MOEST, D.R. et al. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. **Am Rev Respir Dis.**, v. 45, p. 317–325, 1992.

CANTIN, A.M.; NORTH, S.L.; HUBBARD, R.C. et al. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. **J Appl Physiol.**, v. 63, p. 152–157, 1987.

CASTRO, P.F.S.; PEREIRA, A.C.; RODRIGUES, G.J.; et al. A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. **Eur. J. Pharm. Scie.** v. 43, p. 370-377, 2011.

CASTRO, Patrícia Ferreira da Silva. **Estudo do efeito relaxante** de um novo composto doador de óxido nítrico em preparações de traquéias isoladas de ratos. 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011).

CATALLI, A.; ZHANG, D.; JANSSEN, L.J. Receptors and signaling pathway underlying relaxations to isoprostanes in canine and porcine airway smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 283, n. 5, p. L1151-9, 2002.

CERIELLO, A.; MERCURI, F.; QUAGLIARO, L. et al., Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. **Diabetologia**, vol. 44, n. 7, p. 834–838, 2001.

CHHABRA, S.K.; YASIR, A.; CHAUDHRY, K. et al. Effect of ozone on response to ovalbumin its modulation by vitamins C & E in sensitized guinea pigs. **Indian J Med Res.**, v. 132, p. 87-93, 2010.

CHONG NETO, H.J.; ROSÁRIO, N.A.; SOLÉ, D. Asthma and rhinitis in south america: how different they are from other parts of the world. **Allergy Asthma Immunol Res.**, v. 4, n. 2, p. 62-67, 2012.

COELHO, L.P.; SERRA, M.F.; PIRES, A.L. et al. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 327, n. 1, p. 206-214, 2008.

COLEMAN, J.W.; LAYTON, G.T.; STANWORTH, D.R. The kinetics of in vivo sensitization of

- rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. **Eur J Immunol.**, v. 13, p. 994–998, 1983.
- COMHAIR, S.A.; BHATHENA, P.R.; DWEIK, R.A. et al. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. **Lancet**, v. 355, p. 624, 2000.
- COMHAIR, S.A.; BHATHENA, P.R.; FARVER, C. et al. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. **FASEB J.**, v. 15, p. 70–78, 2001.
- COMHAIR, S.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 283, p. L246–L255, 2002.
- CORTIJO, J.; VILLAGRASA, V.; PONS, R. Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: In vitro studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. **Br J Pharmacol.**, v. 127, p. 1641-151, 1999.
- CUMMING, R.G.; MITCHELL, D.J.; LEE- DSEE, S.R. Use de inhaled corticosteroids and risk of cataracts. **N Engl J Med**, v. 337, p. 8-14, 1997.
- III CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA 2002. **Revista AMRIGS**, v. 46, n. 3,4, p. 151-172, 2002.
- DASTIDAR, S.G.; RAY, A.; SHIRUMALLA, R. et al. Pharmacology of a novel, orally active PDE4 inhibitor. **Pharmacology**, v. 83, n. 5, p. 275-86, 2009.
- DE GAITANI, C. M.; DE MELO, M. C. C.; LUNARDI, C. N. et al. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 20, p. 195–199, 2009.
- DE LIMA, R.G.; SAUAIA, M.G.; BONAVENTURA, D. et al. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(tpy)NO]³⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation **Inorg. Chim. Acta.**, v. 359, p.2543–2549, 2006.
- DE RAEVE, H.R.; THUNNISSEN, F.B.; KANEKO, F.T. et al. Decreased Cu,Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 272, p. L148–L154, 1997.
- DE SOUSA, A.A.; SOARES, P.M.; DE ALMEIDA, A.N., et al. Antispasmodic effect of mentha piperita essential oil on tracheal smooth muscle of rats. **J. Ethnopharmacol.**, n. 130, v. 2, p. 433-446, 2010.
- DOELMAN, C.J.; BAST, A. Oxygen radicals in lung pathology. **Free Radic Biol Med.**, v. 9, p. 381–400, 1990.
- DUPONT, L.L.; GLYNOS, C.; BRACKE, K.R. et al. Role of the nitric oxide–soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. **Pulm Pharmacol Ther.**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2014.
- ELLIS, J.L. Role of soluble guanylyl cyclase in the relaxations to a nitric oxide donor and to nonadrenergic nerve stimulation in guinea pig trachea and human bronchus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 280, p. 1215–1218, 1997.
- ELLIS, J.L.; CONANAN, N.D. Modulation of relaxant responses evoked by a nitric oxide donor and by nonadrenergic, noncholinergic stimulation by isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors in guinea pig trachea. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 272, n.3, p. 997-1004, 1995.

ESTEVEZ, A.G.; RADU, R.; BARBEITO, L. et al. Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. **J. Neurochem.**, v. 65, p. 1543–1550, 1995.

EUM, S.Y.; NOREL, X.; LEFORT, J. et al. Anaphylactic bronchoconstriction in BP2 mice: interactions between serotonin and acetylcholine. **Br J Pharmacol.**, v. 126, p. 312–316, 1999.

FALLIERS, C.J.; KATSAMPES, C.F. Pharmacologic modification of induced asthma. **Ann Allergy**, v. 36, p. 99-103, 1976.

FLORES-SOTO, E.; REYES-GARCÍA, J.; SOMMER, B. et al. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) refilling is determined by L-type Ca(2+) and store operated Ca(2+) channels in guinea pig airway smooth muscle. **Eur J Pharmacol.**, v. 721, p. 21-28, 2013.

FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F.P. Airway epithelium: more than just a barrier! **Trends Pharmacol. Sci.**, v.19, p. 334-341, 1998.

FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F.P. Airway nitroergic pathways: is there therapeutic potential in asthma and COPD? **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 4, n. 3, p. 202– 206, 2004.

FRANCIS, S.H.; BUSCH, J.L.; CORBIN, J.D. et al. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacol Rev.**, v. 62, n. 3, p.525-563, 2010.

FREEDMAN, J.E.; FREI, B.; WELCH, G.N. et al. Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. **J Clin Invest.**, v. 96, p. 394–400, 1995.

FUJIMURA, M.; KAMIO, Y.; MYOU, S. et al. Effect of a phosphodiesterase 3 inhibitor, cilostazol, on bronchial hyperresponsiveness in elderly patients with asthma. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 114, p. 379-384, 1997.

FURCHGOTT, R.F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Biosci. Rep.**, v. 19, n. 4, p. 235-251, 1999.

GAO, Y.D.; XIONG, S.D.; XU, Y.J. et al. The effect of nitric oxide on potassium channels of bronchial smooth muscle cells from asthmatic rats. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi**, v. 26, p. 615-618, 2003.

GASTON, B.; DRAZEN, J.M.; LOSCALZO, J. et al. The biology of nitrogen oxides in the airways. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 149, p. 538–551, 1994.

GE, Y.B.; DAI, Q.; WAN, D.R. et al. Relaxant effect of 1-butanol fraction from *Elaeagnus pungens* leaf through inhibiting L-type Ca²⁺ channel on guinea pig tracheal smooth muscle. **J Ethnopharmacol.**, v. 150, n. 1, p. 196-201, 2013.

GINA. GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2014**. Disponível em <www.ginathma.org>. Acesso: 25 de julho de 2014.

GIRODET, P.O.; OZIER, A.; CARVALHO, G. et al. Ca(2+)-activated K(+) channel-3.1 blocker TRAM-34 attenuates airway remodeling and eosinophilia in a murine asthma model. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 48, n. 2, p. 212-9, 2013.

GOLAN, David E. **Princípios de Farmacologia: a Base Fisiológica da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **The nitrites**. In *The pharmacological basis of therapeutics*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1941.

- GOYAL, M.; JASEJA, H.; VERMA, N. Increased parasympathetic tone as the underlying cause of asthma: A hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 74, p. 661–664, 2010.
- GUO, F.H.; DE RAEVE, H.R.; RICE, T.W. et al. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 92, n. 17, p. 7809-7813, 1995.
- GÖNCZI, M.; PAPP, R.; KOVÁCS, M. et al. Modulation of gap junctions by nitric oxide contributes to the anti-arrhythmic effect of sodium nitroprusside? **Br. J. Pharmacol.**, v. 156, p. 786–793, 2009.
- HAMACHER, J.; EICHERT, K.; BRAUN, C. et al. Montelukast exerts no acute direct effect on NO synthases. **Pulm Pharmacol Ther.**, v. 20, p. 525-533, 2007.
- HAMID, Q.; SPRINGALL, D.R.; RIVEROS-MORENO, V. et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. **Lancet**, v. 342, p. 1510-1513, 1993.
- HARDIMAN, K. M.; MCNICHOLAS-BEVENSEE, C. M.; FORTENBERRY, J. et al. Regulation of amiloridesensitive Na⁽⁺⁾ transport by basal nitric oxide. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 30, p.720–728; 2004.
- HEFFNER, J.E.; REPINE, J.E. Pulmonary strategies of antioxidant defense. **Am Rev Respir Dis.**, v. 140, p. 531–554, 1989.
- HELMS, M. N.; YU, L.; MALIK, B. et al. Role of SGK1 in nitric oxide inhibition of ENaC in Na⁺-transporting epithelia. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 289, p. C717–C726, 2005.
- HENRY, Y. ; DUCROCQ, C.; DRAPIER, J.C. et al. Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. **Eur Biophys J.**, v. 20, p.1–15, 1991.
- HOLT, P.G.; SLY, P.D. Prevention of allergic respiratory disease in infants: current aspects and future perspectives. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.**, v. 7, p. 547–555, 2007.
- HOMER, K.; WANSTALL, J. In vitro comparison of two NONOates (novel nitric oxide donors) on rat pulmonary arteries. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 356, p. 49–57, 1998.
- HOMER, K.L.; WANSTALL, J.C. Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, p. 673–682, 2000.
- HOWELL, R.E.; SICKELS, B.D.; WOEPPEL, S.L. Pulmonary antiallergic and bronchodilator effects of isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors in guinea pigs. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 264, p. 609-615, 1993.
- HÖGMAN, M.; FROSTELL, C.G.; HEDENSTRÖM, H. et al. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 148, p. 1474-1478, 1993.
- IACOVIDOU, N.; SYGGELOU, A.; FANOS, V. et al. The use of sildenafil in the treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn: a review of the literature. **Curr Pharm Des.**, v.18, n. 21, p. 3034-45, 2012.
- ICHINOSE, M. Differences of inflammatory mechanisms in asthma and COPD. **Allergology International.**, v. 58, p. 307-313, 2009.
- IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, n. 4, p. 485-490, 1991.
- INTAPAD, S.; DIMITROPOULOU, C.; SNEAD, C et al. Regulation of asthmatic airway relaxation by estrogen and heat shock protein 90. **J. Cell. Physiol.**, v. 227, p. 3036–3043,

2012.

JANSSEN, L.J.; WATTIE, J.; LU-CHAO, H. et al. Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, p. 1142–1151, 2001.

JONES, K.A.; LORENZ, R.R.; WARNER, D.O. et al. Changes in cytosolic cGMP and calcium in airway smooth muscle relaxed by 3-morpholinopyridone. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. L9-16, 1994.

JONES, T. R.; CHARETTE, L.; GARCIA, M.L. et al. Selective inhibition of relaxation of guinea-pig trachea by charybdotoxin, a potent Ca⁺⁺-activated K⁺ channel inhibitor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 255, p. 697-706, 1990.

KACMAREK, R.M.; RIPPLE, R.; COCKRILL, B.A. et al. Inhaled nitric oxide. A bronchodilator in mild asthmatics with methacholine-induced bronchospasm. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 153, n. 1, p. 128-135, 1996.

KANAZAWA, H.; KURIHARA, N.; HIRATA, K. et al. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. **Chest.**, v. 100, p. 1319–1322, 1991.

KANIKADAN, P.Y.D; SERTIÉ, J.A.A; OLIVEIRA-FILHO, R.R. et al. Protector mechanisms of the association between gastroesophageal reflux disease and asthma. experimental study in rats. **Arq. Gastroenterol.**, v. 45, p. 243-8, 2008.

KANN, M.S.; JOHNSON, D.E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Sci.**, v. 56, n. 25, p. 2229-38, 1993.

KANNAN, M.S.; DANIEL, E.E. Formation of gap junctions by treatment in vitro with potassium conductance blockers. **J. Cell Biol.**, v. 78, p. 338–348, 1978.

KARAKI, H.; SATO, K.; OZAKI, H. et al. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 156, n. 2, p. 259-266, 1988.

KHARITONOV, S.A. Influence of different therapeutic strategies on exhaled NO and lung inflammation in asthma and COPD. **Vascul. Pharmacol.**, v. 43, p. 371 – 378, 2005.

KHARITONOV, S.A.; BARNES, P.J. Exhaled markers of pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 163, n. 7, p. 1693–1722, 2001.

KHARITONOV, S.A.; BARNES, P.J. Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Curr Allergy Asthma Rep.**, v. 3, n. 2, p. 121-9, 2003.

Curr Allergy Asthma Rep

KHARITONOV, S.A., YATES, D.H., ROBBINS, R.A. et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. **Lancet**, v. 343, n. 8890, p. 133 – 135, 1994.

KOBAYASHI, M.; KUBO, S.; HIRANO, Y. et al. Anti-asthmatic effect of ASP3258, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor. **Int Immunopharmacol.**, v. 12, n. 1, p. 50-58, 2012

KOTT, K.S.; PINKERTON, K.E.; BRIC, J.M. et al. Methacholine responsiveness of proximal and distal airways of monkeys and rats using videomicroscopy. **J Appl Physiol.**, n. 92, v. 3, p. 989-96, 2002.

KUCHAREWICZ, I.; BODZENTA-LUKASZYK, A.; BUCZKO, W. Experimental asthma in rats. **Pharmacol Rep.**, v. 60, p. 783–788, 2008.

KUMAR, N.M.; GILULA, N.B. The gap junction communication channel. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 381–388, 1996.

LAMARQUE, D.; WHITTLE, B.J. Role of oxygen-derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 277, p. 187–194, 1995.

LAMPE, P.D.; LAU, A.F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 7, p. 1171–1186, 2004.

LI, D.; SHIRAKAMI, G.; ZHAN, X. et al. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 23, p.175–181, 2000.

LIN, R.; WU, B.; LO, Y. et al. A xanthine-based epithelium-dependent airway relaxant kmup-3 (7-[2-[4-(4-nitrobenzene)piperazinyl]ethyl]-1,3-dimethylxanthine) increases respiratory performance and protects against tumor necrosis factor- α -induced tracheal contraction, involving nitric oxide release and expression of cgmp and protein kinase g. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p. 709–717, 2006.

LIU, B.; YANG, J.; WEN, Q. et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, relaxes guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro and in vivo: role of cGMP/PKG pathway. **Eur J Pharmacol.**, v. 10, p. 257-266, 2008.

LUNARDI, C.N.; CACCIARI, A.L.; DA SILVA, R.S. et al. Cytosolic calcium concentration is reduced by photolysis of a nitrosyl ruthenium complex in vascular smooth muscle cells. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 252–258, 2006.

LUNARDI, C.N.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S. et al. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)(2)(NO)](PF(6)) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. **Vascul. Pharmacol.**, v. 47, n. 2-3, p. 139-144, 2007.

MARQUES, M.J.; SANTO NETO, H.; MEIRELLES, U.M. Effects of methylene blue and indomethacin on sodium nitroprusside-induced relaxations of the guinea pig tracheal smooth muscle. **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.**, v. 48, n. 2, p. 83-87, 1998.

MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S. et al. Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, n. 59, p. 469-78, 2004.

MATSUDA, F.; SUGAHARA, K.; SUGITA, M. et al. Comparative effect of amrinone, aminophylline and diltiazem on rat airway smooth muscle. **Acta Anaesthesiol.**, v. 44, p. 763-766, 2000.

MAYR, S.I.; ZUBERI, R.I.; LIU, F.T. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. **Braz J Med Biol Res.**, n. 36, p. 821–7, 2003.

MCCANN, J.D.; MATSUDA, J.; GARCIA, M. et al. Basolateral K⁺ channels in airway epithelia. I. Regulation by Ca²⁺ and block by charybdotoxin. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. L334-342, 1990.

MCDANIEL, N.L.; CHEN, X.L.; SINGER, H.A., et al. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing [Ca²⁺]_i and uncoupling stress from myosin phosphorylation. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. C461-C467, 1992.

MCINTYRE, M.; BOHR, D.F.; DOMINICZAK, A.F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, p. 539-45, 1999.

MIYOSHI, H.; NAKAYA, Y.; MORITOKI, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells. **Febs Letters**, v. 345, n. 1, p. 47-49, 1994.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol.**, v. 7, p. 145–173, 1989.

MUNHOZ, F.C.; POTJE, S.R.; PEREIRA, A.C. et al. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺ in spontaneously hypertensive rats. **Nitric oxide**, v. 26, p. 111-117, 2012.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J. Clin. Invest.**, v. 78, n. 1, p. 1-5, 1986.

NAKAHARA, T.; MORIUCHI, H.; YUNOKI, M. et al. Involvement of K⁺ channel in procainamide-induced relaxation of bovine tracheal smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 402, p. 143–149, 2000.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, p. 3051-3064, 1992.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. C799-C822, 1995.

NIJKAMP, F.P.; FOLKERTS, G. Nitric oxide and bronchial hyperresponsiveness. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 329, n. 1, p. 81-96, 1995.

NISHIDA, K.; HARRISON, D.G.; NAVAS, J.P. et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. **J. Clin. Invest.**, v. 90, p. 2092-2096, 1992.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>>. Acesso em 25 de julho de 2014.

PAPAPETROPOULOS, A.; ABOU-MOHAMED, G.; MARCZIN, N. et al. Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 beta. **Br J Pharmacol.**, v. 118, p. 1359 – 1366, 1996.

PAPAPETROPOULOS, A.; SIMOES, D.C.; XANTHOU, G. et al. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 290, p. L179-L184, 2006.

PARK, H.J.; MOON, K.H.; LEE, S.W. et al. Mirodenafil for the treatment of erectile dysfunction: a systematic review of the literature. **World J Mens Health**, v. 32, n. 1, p.18-27, 2014.

PARLAK, A.; YILDIRIM, S.; BAGCIVAN, I. et al. Role of new agents affecting NO/cGMP pathway on ovalbumin-sensitized guinea pig trachea. **Exp Lung Res.**, v. 38, p. 20-26, 2012.

PATEL, L.S.; MITCHELL, C.K.; DUBINSKY, W.P. et al. Regulation of gap junction coupling through the neuronal connexin Cx35 by nitric oxide and cGMP. **Cell Commun. Adhes.**, v. 13, p. 41–54, 2006.

PAULO, M.; RODRIGUES, G.J.; SILVA, R.S. et al. A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar artery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 344-350, 2012.

PEARCE, N.; AL-T-KHALED, N.; BEASLEY, R. et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) **Thorax**, v. 62, p. 758–76, 2007.

PELAIA, G.; GALLELLI, L.; VATRELLA, A. et al. Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Life Sci.**, v. 70, n. 9, p. 977-90, 2002.

- PEREIRA, A. C.; LUNARDI, C. N.; PAULO, M. et al. Nitric oxide generated by the compound RuBPY promotes the vascular smooth cell membrane hyperpolarization. **Eur. J. Pharmacol. Sci.**, v. 48, p. 604–610, 2013.
- PEREIRA, A.C.; FORD, P.C.; DA SILVA, R.S. et al. Ruthenium-nitrite complex as pro-drug releases NO in a tissue and enzyme-dependent way. **Nitric Oxide**, v. 24, p. 192–198, 2011.
- PFEFFER, K.D.; ELLISON, G.; ROBERTSON, D. et al. The effect of inhaled nitric oxide in pediatric asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 153, n. 2, p. 747-751, 1996.
- PLANE, F.; HURRELL, A.; JEREMY, J.Y. et al. Evidence that potassium channels make a major contribution to SIN-1 evoked relaxation in the rat isolated mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 1557–1562, 1996.
- RABE. K.F.; MAGNUSSEN, H.; DENT, G. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants. **Eur. Respir. J.**, v. 8, p. 637-642, 1995.
- REDINGTON, A.E. Modulation of nitric oxide pathways: Therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 533, p. 263–276, 2006.
- REED, C.E.; OFFORD, K.P.; NELSON, H.S. et al. Aerosol beclomethasone dipropionate spray compared with theophylline as primary treatment for chronic mild-to-moderate asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 101, p. 14-23, 1998.
- RICCIARDOLO, F. L. M.; STERK, P. J.; GASTON, B. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev.**, v. 84, p. 731–765, 2004.
- ROCCIARDOLO, F. L. M.; SORBELLO, v.; CIPRANDI, G. A pathophysiological approach for FeNO: A biomarker for asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*, v. 43. n. 4, p. S0301-0546, 2015.
- ROBERT, S.; TEPPER, R.S.; LLAPUR, C.J. et al. Expired nitric oxide and airway reactivity in infants at risk for asthma. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 122, p. 760-765, 2008.
- ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J. et al. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am J Physiol.**, v. 265, p. C299-303, 1993.
- RODRIGUES, G. J.; LUNARDI, C.N.; LIMA R. G. et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 18, p. 176–183, 2008.
- RODRIGUES, G.J.; CICILLINI, S.A.; SILVA, R.S. et al. Mechanisms underlying the vascular relaxation induced by a new nitric oxide generator. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 331-337, 2011.
- ROSE, F.; GUTHMANN, B.; TENENBAUM, T.; ET al. Apical, but not basolateral, endotoxin preincubation protects alveolar epithelial cells against hydrogen peroxide-induced loss of barrier function: the role of nitric oxide synthesis. **J.Immunol.**, v. 169, p.1474–1481; 2002.
- ROSSI, J. A. Nedocromil sódico. **J. Pneumol.** v. 21, p. 295-300, 1995.
- ROUX, E.; MARHL, M. Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in Ca²⁺ removal in airway myocytes. **Biophys J.**, v. 86, n. 4, p. 2583-2595, 2004.
- SALEH, D.; ERNST, P.; LIM, S. et al. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. **FASEB J.**, v. 12, n.11, p. 929– 937, 1998.

SANNA, A.; KURTANSKY, A.; VERITER, C. et al. Bronchodilator effect of inhaled nitric oxide in healthy men. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 150, p. 1702-1704, 1994.

SAUAIA, M.G.; DE LIMA, R.G.; TEDESCO, A.C. et al. Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 14718-14719, 2003.

SCHAAFSMA, D.; GOSENS, R.; RIS, J.M. et al. Insulin induces airway smooth muscle contraction. **Br. J. Pharmacol.**, v. 150, p. 136-142, 2007.

SEDGWICK, J.B. **Mechanisms of eosinophil activation.** In: Busse WW, Holgate ST (eds). *Asthma and Rhinitis.* Boston: Blackwell Scientific Publications, p. 285-97, 1995.

SELG, E.; LÅSTBOM, L.; RYRFELDT, A. et al. Effects of selective and non-selective COX inhibitors on antigen-induced release of prostanoid mediators and bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 78, p. 89-97, 2008.

SHAH, A. M. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. **Cardiovasc. Res.**, v. 31, p. 847-867, 1996.

SIENRA-MONGE, J.J.; RAMIREZ-AGUILAR, M.; MORENO-MACIAS, H. et al. Antioxidant supplementation and nasal inflammatory responses among young asthmatics exposed to high levels of ozone. **Clin Exp Immunol.**, v. 138, p. 317-322, 2004.

SIMS, S.M.; JIAO, Y.; ZHENG, Z.G. Intracellular calcium stores in isolated tracheal smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. L300-309, 1996.

SMITH, L.J.; HOUSTON, M.; ANDERSON, J. Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. **Am Rev Respir Dis.**, v. 147, p. 1461-1464, 1993.

SMITH, L.J.; SHAMSUDDIN, M.; SPORN, P.H. et al. Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma. **Free Radic Biol Med.**, v. 22, p. 1301-1307, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA. **J. Bras. Pneumol.**, n. 32, v. 7, p. S447-S474, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA -2012. **J Bras Pneumol.**, v. 38, n.1, p. S1-S46, 2012.

SOLÉ, D.; CAMELO-NUNES, I.C.; WANDALSEN, G.F. et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema in Brazilian adolescents related to exposure to gaseous air pollutants and socioeconomic status. **J Investig Allergol Clin Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 6-13, 2007.

SOLÉ, D.; WANDALSEN, G.F.; CAMELO-NUNES, I.C. et al. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. **J Pediatr.**, v. 82, n. 5, p. 341-6, 2006.

SOLÉ, D.; CAMELO-NUNES, I.C.; WANDALSEN, G.F. et al. Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Rev Paul Pediatr.**, v. 32, n. 1, p. 114-25, 2014b.

SOLÉ, D.; FILHO, N.A.; SARINHO, E.S. et al. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012). **Rev Bras Epidemiol.**, v. 17, n. 1, p. 106-15, 2014a.

- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-6, 1994.
- STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, v. 258, p. 1898– 1902, 1992.
- STANDEN, N.B.; QUAYLE, J.M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 164, p. 549-557, 1998.
- STUART-SMITH, K.; BYNOE, T.C.; LINDEMAN, K.S. et al. Differential effects of nitrovasodilators and nitric oxide on porcine tracheal and bronchial muscle in vitro. **J. Appl. Physiol.**, v. 77, p. 1142-1147, 1994.
- TAKATA M, FILIPPOV G, LIU H. et al. Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via NO-dependent and NO-independent mechanisms. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 280, p. L272–L278, 2001.
- TANAKA, H.; OGAWA, K.; TAKAGI, K. et al. Inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase by xanthine derivatives relaxes guinea-pig tracheal smooth muscle. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 18, p. 163-168, 1991.
- THIPPESWAMY, T.; MCKAY, J.S.; QUINN, J.P. et al. Nitric oxide, a biological double-faced janus-is this good or bad? **Histol. Histopathol.**, v. 21, n. 4, p. 445-458, 2006.
- THOMAS, A.P.; BIRD, G.S.T.J.; HAJOCZKY, G. et al. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. **FASEB J.**, v. 10, p. 1505-1517, 1996.
- TOQUE, H.A.; MONICA, F.Z.; MORGANTI, R.P. et al. Mechanisms of relaxant activity of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in rat tracheal smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 645, p. 158-164, 2010.
- VAN DER VELDEN, J.; SUM, G.; BARKER, D. et al. K(Ca)_{3.1} channel-blockade attenuates airway pathophysiology in a sheep model of chronic asthma. **PLoS One**, v. 8; n. 6, p. e 866886, 2013.
- VILLA, L.M.; SALAS, E.; DARLEY-USMAR, V.M. et al. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, p. 12383–12387, 1994.
- VONBANK, K.; ZIESCHE, R.; HIGENBOTTAM, T.W. et al. Controlled prospective randomised trial on the effects on pulmonary haemodynamics of the ambulatory long term use of nitric oxide and oxygen in patients with severe COPD. **Thorax**, v. 58, p. 289-293, 2003.
- VOS, J.G.; BOERKAMP, J.; BUYS, J. et al. Ovalbumin immunity in the rat: simultaneous testing of IgM, IgG and IgE response measured by ELISA and delayed-type hypersensitivity. **Scand J Immunol**, v. 12, p. 289–95, 2008.
- WANG, Y.X.; LEGZDINS, P.; POON, J.S. et al. Vasodilator effects of organotransition-metal nitrosyl complexes, novel nitric oxide donors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 35, p. 73–77, 2000.
- WATTS, S.W.; TSAI, M.L.; LOCH-CARUSO, R. et al. Gap junctional communication and vascular smooth muscle reactivity: use of tetraethylammonium chloride. **J. Vasc. Res.**, v. 31, p. 307-313, 1994.
- WU, B; LIN, R.; LO, Y. et al. KMUP-1, a xanthine derivative, induces relaxation of guinea-pig isolated trachea: the role of the epithelium, cyclic nucleotides and K + channels. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 1105-1114, 2004.

XIONG, Y.; LEI, M.; FU, S. et al. Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. **Life Sciences**, v. 77, n. 2, p.149–159, 2005.

YAKAZU, Y.; IWASAWA, K.; NARITA, H. et al. Hemodynamic and sympathetic effects of fenoldopam and sodium nitroprusside. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v.45, p. 1176-1180, 2001.

ZHOU, H.L.; TORPHY, T.L. Relationship between cyclic guanosine monophosphate accumulation and relaxation of canine trachealis induced by nitrovasodilators. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 258, p.972-978, 1991.

ZOSKY, G.R.; SLY, P.D. Animal models of asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 37, p. 973–988, 2007.

ZUO, L.; KOOZECHIAN, M.S.; CHEN, L.L. Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 112, p. 18-22, 2014.

NOTA

A formatação deste trabalho teve como base as Normas:

- Capa, layout dos capítulos e textos e sistema de numeração: Modelo do Programa de Pós-Graduação;
- Resumo: NBR 6028/2003;
- Sumário: NBR 6027/2013;
- Numeração Progressiva: NBR 6024/2012;
- Ilustrações: NBR 14724/2011;
- Tabelas: NBR 14724/2011;
- Citações: NBR 10520/2002;
- Referências: NBR 6023/2002.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética

	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA</p>	
Goiânia, 17 de junho de 2013.		
<p>PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 029/13</p>		PROTOCOLO Nº: RECEBIDO EM:
<p>1. Título do Protocolo de Pesquisa: Efeitos do Óxido Nítrico (NO) e de extratos vegetais sobre o músculo liso traqueal de ratos saudáveis ou com asma experimental</p>		
<p>2. Finalidade Pesquisa (farmacologia)</p>		
<p>3. Pesquisador responsável</p> <p style="margin-left: 40px;">Matheus Lavorenti Rocha Patrícia Ferreira da Silva Castro Emily Kussmaul Gonçalves</p>		
<p>5. Unidade onde será realizada a pesquisa</p> <p style="margin-left: 40px;">Laboratório de Farmacologia Cardiovascular. Faculdade de farmácia – UFG</p>		
<p>6. Objetivo(s) da pesquisa</p> <p>O objetivo deste projeto consiste em estudar os principais mecanismos celulares envolvidos no efeito do óxido nítrico (NO) e extratos vegetais sobre músculo liso traqueal isolados de ratos saudáveis e asmáticos (asma experimental), a fim de verificar possíveis alterações induzidas por este processo inflamatório sobre a via intracelular de sinalização NO/GMPc/PKG.</p>		
<p>7. Animal utilizado (fonte de obtenção/espécie/Nº de grupos/Nº de animais por grupo)</p> <p>Serão utilizados ratos Wistar machos (180-200g) proveniente do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Aproximadamente 28 grupos (14 saudáveis e 14 asmáticos) com 4-6 animais por grupo. É importante ressaltar que cada animal fornece uma traqueia, e cada uma das traqueias serão divididas em 3 ou 4 anéis de aproximadamente 3-4mm, e cada anel será utilizado para um diferente protocolo, aumentando assim o rendimento dos experimentos e diminuindo a quantidade de animais necessária para a realização do projeto.</p>		
<p>Parecer : O número de animais é aceitável e justificável.</p>		
<p><i>Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA</i> Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus - Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215. E-mail: ceua.ufg@gmail.com</p>		



8. Critérios utilizados para definir o tamanho da amostra. Incluir discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos apresentando os descritores da busca bibliográfica. Previsas experiências com os mesmos métodos e protocolos utilizados nos mostram que a amostra entre 4 a 6 animais é um bom intervalo para o tipo de protocolo realizado. A suficiência do tamanho da amostra será verificada através da estatística das médias (análise de variância - ANOVA) dos valores de relaxamento muscular (em %). No caso, o erro padrão da média não pode ser superior a 10% do valor da média, o que confere uma amostra próximo de 4 a 6 animais por grupo, aproximadamente. É importante ressaltar que cada animal fornece uma traqueia, e cada uma das traqueias será divididas em 3 a 4 anéis de aproximadamente 3-4mm, e cada anel será utilizado para um diferente protocolo, aumentando assim o rendimento dos experimentos e diminuindo a quantidade de animais necessária para a realização do projeto.

Parecer: A definição do número de animais se encontra dentro dos princípios éticos vigentes. Bibliografia adequada justificando a necessidade do uso de animais.

9. Descrição das instalações e manejo dos animais (alojamento e ambiência/alimentação e hidratação)

Os animais serão mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia em gaiolas de polietileno (41x34x16cm) com serragem trocada 3x/semana, com ração de roedores de água de torneira à vontade, com temperatura de aproximadamente 23-25°C, umidade ambiente e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Parecer : A manipulação dos animais se encontra dentro dos princípios éticos vigentes.

10. Análise crítica dos riscos e benefícios da pesquisa Os únicos pontos relevantes em relação aos riscos da pesquisa são em relação ao uso de animais, onde os pesquisadores estarão em contato direto com o animal acordado, e sujeitos então ao ataque, mordidas, pêlos, fezes, urina e sangue. Para isto, sempre serão realizados com a devida proteção.

Os benefícios principais é em relação às descobertas de novos agentes terapêuticos no tratamento da asma, sendo estes agentes um produto sintético, doador de óxido nítrico e já com comprovada ação relaxante em músculo liso, e um possível fitoterápico, onde também serão apontados os benefícios em relação aos tratamentos de rotina hoje utilizados.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

E-mail: ceua.ufv@gmail.com



Parecer : A pesquisa se encontra dentro dos princípios éticos vigentes.

11. Cronograma (Período estabelecido para coleta de dados ou duração do experimento e/ou aulas práticas) Por se tratar de um projeto de doutorado e outro de iniciação científica, estipulamos o prazo máximo de 4 anos para finalização dos protocolos. Os protocolos experimentais serão distribuídos em intervalos regulares, acompanhando a disponibilidade dos pesquisadores, períodos de férias, e disponibilidade das instalações da UFG. INÍCIO DO PROJETO: 20/06/2013/ CONCLUSÃO DO PROJETO: 20/06/2017

Parecer : O período de vigência está de acordo com os princípios éticos vigentes.

12. Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais durante a experimentação. Pontos finais humanitários.

Os animais serão mantidos em gaiolas de polietileno (41x34x16cm) com serragem trocada 3x/semana, com livre acesso a água e ração e ciclo claro/escuro de 12 horas. Nos experimentos ex vivo, os animais serão sacrificados sob efeito de anestésico inalatório (0,5 mL/ animal), mantendo-se todo critério de boas práticas laboratoriais e uso de animais para realização dos experimentos.

13. Descrição e justificativa do método de eutanásia e destino dos animais após a experimentação

Os ratos serão anestesiados com isoflurano inalatório e em seguida a eutanásia será realizada por exsanguinação pela artéria aorta abdominal. As carcaças serão acondicionadas em sacos plásticos próprio para lixo biológico (cor branca), guardados em freezer (-20°C). Após isto, serão levados à faculdade de medicina veterinária onde serão incinerados.

Parecer: Método de eutanásia adequado.

14. Riscos aos pesquisadores/alunos (físicos, biológicos, psicológicos, sociais)

Os riscos aos alunos e pesquisadores serão riscos inerentes ao uso de animais de laboratório. Estarão em contato direto com pêlos, fezes, urina e sangue. Para isto, os experimentos sempre serão realizados com a devida proteção com luvas, óculos e jaleco. Também serão adotadas boas



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



práticas de manuseios de animais para evitar ataques e mordidas decorrente da manipulação dos ratos.

Parecer: Riscos aceitáveis e previstos.

Conclusão: Aprovado

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Prof. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus
Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
E-mail: ceua.ufg@gmail.com

Anexo 2 – Artigo submetido

Revista: European Journal Pharmaceutical Science

ISSN:0928-0987

Qualis em Medicina II: A2

Fator de impacto: 3,005

Comparison between the nitric oxide-donors, sodium nitroprusside and a new ruthenium complex, in inducing the relaxation of airway smooth muscle in rats with experimental asthma

Patrícia F. S. Castro^a, Carolina F. Reis^a, Daniela Lobo de Andrade^a, Sérgio H. N. Costa^a, Aline C. Batista^b, Roberto S. da Silva^c, and Matheus L. Rocha^{a,*}

^aFaculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, R. 240 s/n, 74605-220, Goiânia, GO, Brazil

^bFaculty of Odontology, Federal University of Goiás, Av. Universitária s/n, 74605-220 Goiânia, GO, Brazil

^cFaculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. do Café s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Abstract

This study evaluated and compared the relaxation mechanisms of two nitric oxide-donors, ruthenium compound $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY) and sodium nitroprusside (SNP), in the isolated tracheas of healthy rats (Sham group) and in an experimental model of asthma induced by ovalbumin (OVA group). The isolated trachea was sectioned into rings and contracted with carbachol in an organ chamber to perform relaxation studies. The relaxation effect of TERPY and SNP were evaluated at concentrations increasing from 10 nM to 100 μM . The contribution of the K^+ channels, the importance of the sGC/cGMP pathway, the inhibition of PDEs and the influence of extra and intracellular Ca^{2+} sources were analyzed. Analyses were performed under light microscopy for evidence of inflammatory infiltrate and bronchodilation brought about by TERPY in bronchiole slices of asthmatic animals. The results verified that sensitization with OVA leads to an intense inflammatory process. TERPY and SNP provoked relaxation of the tracheal smooth muscle in a dependent concentration way in both groups. However, the maximum effect induced by TERPY was higher than that of SNP in both the Sham and OVA groups. There were differences between the two groups in term of the TERPY relaxation mechanism. In the Sham group, TERPY relaxation was induced by the activation of K^+ channels and reduction of the calcium influx, while in the OVA group, these same effects were also provoked by TERPY, but with participation of the sGC/cGMP pathway. In both groups, SNP relaxation occurred through the activation of K^+ channels, the sGC/cGMP pathway and reduction of the calcium influx. However, the activation of the sGC pathway seems to be reduced in the OVA group, as is the role of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Furthermore, TERPY is capable of reversing the contraction of carbachol in asthmatic bronchioles. In conclusion, both TERPY and SNP relaxation mechanisms were modified by inflammatory process. SNP presented less relaxation than TERPY, which induced full relaxation. SNP-induced relaxation seemed to be more dependent on the sGC/cGMP pathway, mainly in the Sham group, while TERPY-induced relaxation involves greater participation of K^+ and Ca^{2+} fluxes through the plasma membrane.

Keywords: Nitric oxide; airway smooth muscle; asthma; ruthenium complex; K⁺ channels

1. Introduction

Asthma, a chronic inflammatory disease associated with hypersensitivity in the airways, leads to wheezing, dyspnoea and coughing, particularly at night or in the early morning. Its prevalence varies between 1 and 16% of the world population and its clinical treatment is based on the use of bronchodilators and antiinflammatory drugs (Chung et al., 2014).

Nitric oxide (NO), a major modulator of airways, leads to bronchodilation, controls the frequency of ciliary beating, helps in the transportation of electrolytes through the epithelium and participates in the innate immune response, all of which make it an effective alternative for the treatment of inflammatory respiratory diseases such as asthma (Li et al., 2000; Rose et al., 2002).

NO is very unstable in physiological conditions and can react almost instantly to molecules with unpaired electrons (McIntyre et al., 1999). An alternative here is the use of NO donor molecules, such as sodium nitroprusside (SNP). However, there are serious limitations to the use of this drug because of the liberation of cyanide as a product of biotransformation. Moreover, the administration of SNP can lead to a quick and severe drop in blood pressure and reflex tachycardia (Yakazu et al., 2001). Along with its side effects, it only exerts a mild effect in relaxing airway smooth muscle (Castro et al., 2011; Toque et al., 2010; Vaali et al., 2000).

An alternative to SNP could be ruthenium compounds, which have shown biological activities similar to those of NO, such as vascular and tracheal smooth muscle relaxation, reduced blood pressure, inhibition of platelet aggregation and an increase in cGMP levels (Bonaventura et al., 2007; Castro et al., 2011; de Gaitani et al., 2009; Lunardi et al., 2007).

A compound derived from ruthenium [Ru(terpy)(bdq)NO⁺]³⁺, (TERPY), [terpy = terpyridine and bdq = 1.2-benzoquinone-diimine (Fig. 1) (de Lima et al., 2006)], is a promising NO-donor compound whose action has been described as vasodilatatory in both the resistance and conductance arteries of

normotensive and hypertensive rats (Bonaventura et al., 2011; Araújo et al., 2013; Munhoz et al., 2012), and as bronchodilatory in healthy rats (Castro et al., 2011). Significantly, it does not affect the vasculature of the central nervous system, which would make it free from central side effects, such as headaches, common to other NO-donors (Paulo et al., 2012). However, no research has evaluated the effects of TERPY in inducing relaxation in the airways of asthmatic rats. With that in mind, this study set out to test and characterize the action mechanisms of TERPY in the tracheas of rats with experimentally-induced asthma and compare them to the relaxation induced by the classic NO-donor SNP.

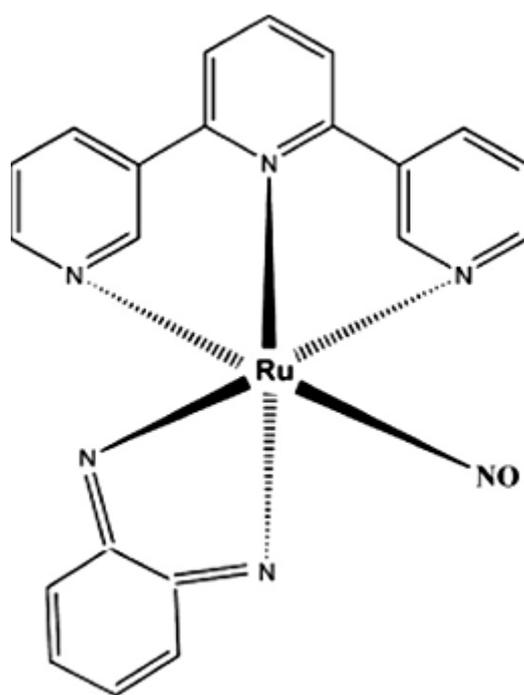


Fig. 1. Structure of $[Ru(terpy)(bdq)NO]^{3+}$.

2. Materials and methods

2.1. Animal

Male Wistar rats (180–220g) from the Central Animal House, at the Federal University of Goiás, were used for the experiments. The animals were housed in a temperature- and light-controlled room ($22\pm 2^\circ\text{C}$; 12h light/dark cycle) in our laboratory with free access to water and rodent chow and acclimatized for a period of at least one week before starting the experiment. They were

handled in accordance with internationally accepted standard guidelines for the use of animals. All procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee at the Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil, under protocol number 029/2013.

Asthma was induced in the rats following the Kanikadan et al. (2008) model with some modifications. In brief, they were sensitized with an intraperitoneal injection of 100 µg of chicken ovalbumin (OVA) mixed with 10 mg of aluminum hydroxide as adjuvant, 1 mL in total (Day 0). After seven days, the animals were subcutaneously injected with 100 µg of OVA dissolved in saline (0.5 mL). On Day 14 the rats were subjected to a single exposure of aerosolized OVA 1% dissolved saline for 30 min using a nebulizer device (0.15-0.25 mL/min, Inalar Compact NS, São Paulo, Brazil) coupled to a plastic inhalation chamber (30 cm x 20 cm x 13 cm). This group was called OVA. Nonsensitized rats were submitted to intraperitoneal and subcutaneous injection with sterile saline. This group was called Sham. On Day 15 of the experiments both groups were anaesthetized and sacrificed by aortic exsanguinations. The trachea was removed, dissected, cleaned and cut into 3-4 mm rings.

2.2. Tracheal Reactivity Studies

The tracheal rings were placed between two stainless steel stirrups and connected to an isometric force transducer. The responses were recorded using a computerized system and WinDaq Resource (DATAQ Instruments, Akron, OH, USA, data acquisition unit) to measure tension in the preparations. They were kept in a chamber containing Krebs solution with the following composition (mM): 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 14.9 NaHCO₃, 5.5 glucose, and 1.6 CaCl₂. The solution was maintained at pH 7.4, and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37 ± 1°C. The rings were initially stretched to a basal tension of 1.0 g over 60 min for stabilization. During this period, tissues were washed every 15 min. After equilibration, the tracheal rings were exposed to cholinergic agonist carbachol (0.5 µM, EC₅₀ previously determined in our laboratory) to obtain 50% of the maximum contractility. Each ring was sequentially washed, re-equilibrated and then left to relax. Again, the preparations were pre-contracted with carbachol (EC₅₀) and

cumulative concentration–response curves for SNP or TERPY (both 10 nM to 100 μ M) added to the organ bath in the absence or presence (30 min) of a pharmacology tool: TEA – tetraethylammonium, non-selective K^+ channel blocker (5 mM), ODQ - 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3a]quinoxalin-1, guanylyl cyclase inhibitor (1 μ M), IBMX - 3-isobutil-1-metilxantine, non-selective phosphodiesterase inhibitor (10 μ M) and CPA - cyclopiazonic acid, selective inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) (10 μ M) to investigate the mechanism(s) responsible for SNP- or TERPY-induced relaxation in the tracheal rings of the Sham and OVA groups of rats.

2.3. Participation of SNP and TERPY in the extracellular Ca^{2+} influx

To further analyze the relative contribution of SNP or TERPY to inhibiting Ca^{2+} influx in the tracheal smooth muscle, the role of extracellular Ca^{2+} mobilization stimulated by a contractile agonist was investigated by $CaCl_2$ -induced contraction in the presence of carbachol. Tracheal rings from Sham and OVA rats were first contracted with a concentrated solution of KCl (75 mM) to produce maximal contraction (100% contraction). Then, the bath chamber was rinsed with a Ca^{2+} -free solution and the rings contracted with carbachol (EC_{50} , 0.5 μ M) to deplete the intracellular Ca^{2+} stores until no contractile response remained (approximately 60 min). After that, the cumulative concentration–response curves for $CaCl_2$ (0.0 – 1.6 mM) were obtained in a Ca^{2+} -free solution containing carbachol (0.5 μ M), in the absence (control) or after a 20 min incubation period with SNP or TERPY (100 μ M).

2.4. Histological Studies

The tracheal rings of Sham and OVA rats were fixed in 10% buffered formaldehyde. 10 mm wide slices were then stained using the standard method with haematoxylin and eosin, Masson's trichrome and Toluidine blue for transmitted-light microscopy (Axio Scope.A1 with AxioCam MRc, Carl Zeiss – 200 and 400X) to identify the absence or presence of an inflammatory process, smooth muscle and mast cells, respectively. In the Toluidine blue slices, mast cells density (μm^2) was calculated across the trachea using an

integration grid (Carl Zeiss 4740680000000-Net micrometer 12.5) with 40x objective.

2.5. Relaxation Bronchi by TERPY

This model was based on studies by Kott et al. (2002), with some modifications. In brief, after sacrificing the asthmatic rats, a lung was removed, kept in a Krebs solution, dissected and cut into 1-2 mm slices with the aid of a scalpel. In the light microscopy (Axio Scope.A1 with AxioCam MRc, Carl Zeiss – 50 X), the bronchioles were identified and their area measured (0 s). The carbachol (0.5 μ M) was added and the contraction was measured at 180s. Immediately after that, the TERPY (100 μ M – EC₁₀₀) was added and relaxation was measured again at 360s.

2.6. Chemicals

The TERPY complex was synthesized and described by de Lima et al. (2006), in *Laboratory of Analytical Chemistry* by Dr. Roberto Santana da Silva. The drugs which included OVA, SNP, carbachol, ODQ, TEA, used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used in the study were commercially available and of reagent grade. OVA was dissolved in 0.9% sterile saline. ODQ and CPA were dissolved in DMSO while the other drugs were dissolved in distilled water.

2.7. Statistical analysis

The data in the graphics are presented as means \pm SEM and “n” indicates the number of rats studied in each set of experiments. The values for reactivity and responses to TERPY or SNP are expressed as percentages of the preceding contraction. The concentration of the compound producing a half-maximal response (EC₅₀) was determined after logarithmic transformation of the normalized concentration–response curves and reported as the negative logarithm ($-\log EC_{50} = pD_2$ values) of the mean of individual values for each tissue, using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The maximum relaxant effect (E_{max}) was considered as the

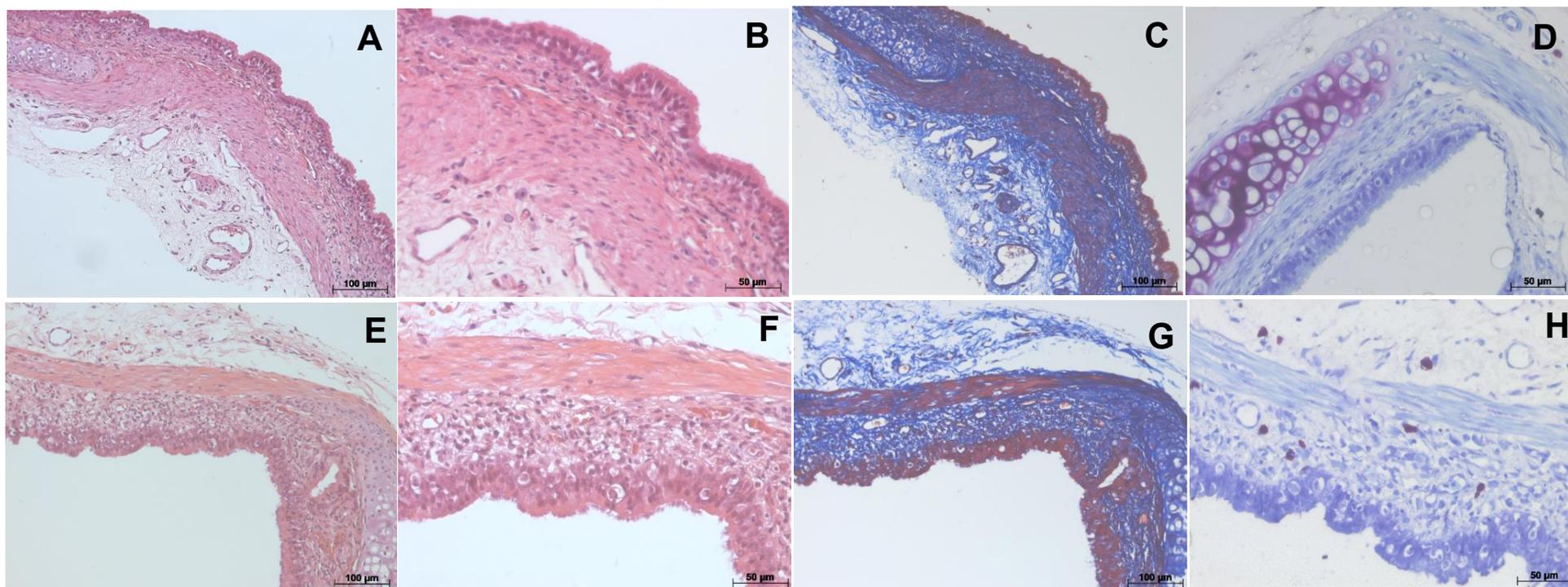
maximal amplitude response reached in concentration–effect curves for relaxant agents. The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Corporation San Diego, CA). Comparisons were made between groups using one-way ANOVA (post-test: Newman–Keuls) and Student’s t test, and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. *Experimental asthma model*

The histological slices in Fig. 2 show cylindrical pseudostratified ciliated epithelium, fibrous connective tissue and smooth muscle attached to hyaline cartilage. Figs. 2A-D present the Sham group trachea and Figs. 2E-H represent the OVA group trachea. Figs. 2E and 2F show intense mononuclear inflammatory infiltrate, and subepithelial permeated by small vessels when compared to Figs. 2A and 2B. Masson’s trichrome showed smooth muscle stains in red in both groups (Figs. 2C and 2G) characterized by long cells and flattened nuclei. Figs. 2D and 2H show mast cells dyed in purple. The Sham group showed 14.7 mast/mm² and the OVA group 101.0 mast/mm² ($p < 0.05$). These findings confirm that sensitization with ovalbumin can generate an inflammatory process in the rat’s airways similar to that of human asthma (Kucharewicz, et al., 2008; Mosmann and Coffman, 1989). The animals submitted to sensitization and the challenge with saline, without OVA, did not present the inflammatory process in the airways, and were therefore healthy. Moreover, the contraction evoked by carbachol (0.5 μ M) in the tracheal rings of the OVA group (2.3 ± 0.3 g, $n=15$) showed an increase of about 44% ($p < 0.01$) when compared to the Sham group (1.6 ± 0.17 g, $n=18$) (data not shown). These results confirm that sensitization with OVA produces tracheal hyperreactivity to colinergic stimulus similar to that of human asthma (Chung et al., 2014).

Fig. 2. Photomicroscopy are transverse histological sections of nonsensitized rat trachea – Sham group - (A-D) and sensitized with OVA – OVA group - (E-H). Hematoxylin- and eosin-staining showed intense mononuclear inflammatory infiltrate subepithelial permeated by blood vessels of small arms in (E) and (F) when compared to (A) and (B). Masson Trichrome-staining showing smooth muscle colored in red (C) and (G). Toluidine blue-staining showing mast cells colored in purple with increased density in sensitized trachea in OVA (H) as compared to Sham (D).



3.2. Relaxant activity of SNP and TERPY in rat tracheal smooth muscle

TERPY and SNP provoked relaxing effects in the tracheas of Sham and OVA rats. Both NO-donors (10 nM to 100 μ M) cumulatively added to the bath solution during the sustained contraction induced by carbachol (EC_{50} , 0.5 μ M) caused concentration-dependent relaxation (Fig. 3).

TERPY was more effective than SNP in both groups. TERPY produced no significant difference of E_{max} between the Sham group ($110.2 \pm 3.2\%$, $n=9$) and the OVA group ($106.1 \pm 1.5\%$, $n=9$). The maximum effect of SNP on the Sham group was $68.3 \pm 3.1\%$ ($n=9$) and on the OVA group $49.9 \pm 2.7\%$ ($n=6$), which shows about 27% impairment ($p<0.001$) in the relaxation of OVA rats (Fig. 3). These data show that SNP was less efficient in inducing tracheal smooth muscle relaxation in the OVA group than in the Sham group. However, TERPY showed the same efficacy in both groups.

The pD_2 of SNP in the Sham group was 6.1 ± 0.07 ($n=9$) and in the OVA group 6.2 ± 0.06 ($n=6$). For TERPY, the pD_2 was 5.1 ± 0.06 , ($n=9$) for the Sham group and 5.1 ± 0.09 , ($n=9$) for the OVA group. Therefore, the inflammatory states in the tracheas did not alter the potency of SNP or TERPY (Fig. 3).

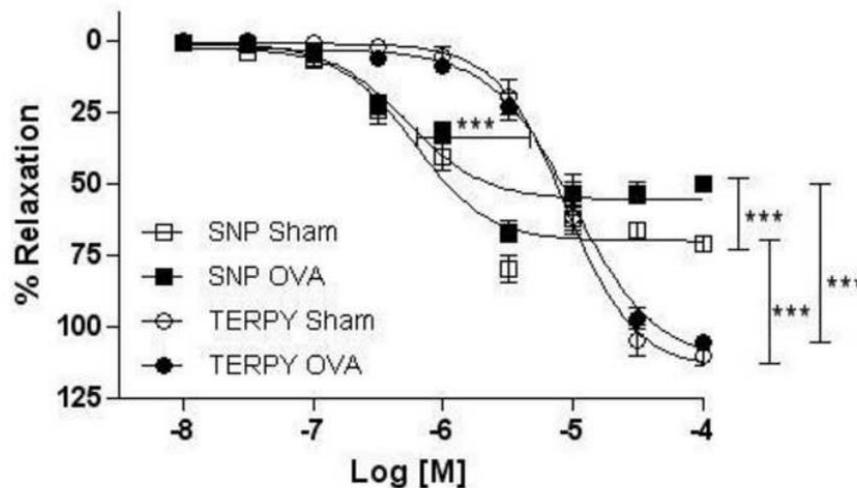


Fig. 3. SNP- and TERPY-induced relaxation in isolated tracheas of Sham and OVA rats. Tracheas were pre-contracted with carbachol and both NO-donors were cumulatively added. (A) Relaxant concentration–response curves of SNP and TERPY. Data are the mean \pm SEM in preparations obtained from different animals. Statistics *** $p<0.001$.

3.3. Participation of sGC and K⁺ channels in tracheal relaxation

The presence of the sGC inhibitor (ODQ) altered the maximum effect and potency of the SNP in the Sham group (Fig. 4A). The E_{\max} and pD_2 values of the SNP were significantly reduced (49% and 15%, respectively, $p < 0.001$) after ODQ treatment in the Sham group. In the OVA group, the ODQ treatment only affected the potency of SNP (Fig. 3A, Table 1). The relaxation stimulated by TERPY was not affected by the ODQ treatment in the Sham group. In the OVA group, only the potency of TERPY was affected, undergoing a reduction from 5.0 ± 0.09 to 4.4 ± 0.08 after sGC inhibition (Fig. 3B, Table 1, $p < 0.001$).

The K⁺ channel blocker (TEA) increased the E_{\max} of SNP in the Sham and OVA groups to about 19% and 63% ($p < 0.05$ and $p < 0.001$), respectively (Fig. 4C and Table 1). The inhibition provoked by TEA reduced the E_{\max} of TERPY to about 56% and 87% in the Sham and OVA groups, respectively (Fig. 4D and Table 1). TEA did not alter the pD_2 of either NO-donor.

3.4. Effects of the PDE and SERCA inhibitors on the relaxation induced by TERPY and SNP

The non-selective PDE inhibitor (IBMX) increased the E_{\max} of SNP in the Sham and OVA groups to about 24% and 104%, respectively (Fig. 5A, Table 1). The IBMX also increased the pD_2 values of the SNP from 6.2 ± 0.26 to 6.5 ± 0.05 in the OVA group. For TERPY, IBMX did not affect E_{\max} . However, the pD_2 was significantly increased after IBMX treatment in both the Sham ($p < 0.01$) and OVA groups ($p < 0.001$) (Fig. 5B, Table 1).

The SERCA inhibitor (CPA) altered the E_{\max} and pD_2 of SNP in the Sham group. The E_{\max} of SNP was reduced by about 43%, while the pD_2 was reduced from 6.1 ± 0.07 to 5.8 ± 0.07 ($p < 0.01$) (Fig. 5C, Table 1). CPA did not alter either the E_{\max} or pD_2 of SNP in the OVA group. On the other hand, CPA reduced the pD_2 of TERPY from 5.0 ± 0.09 to 3.9 ± 0.21 in the OVA group and did not have any significant effect on either the E_{\max} or pD_2 in the Sham group (Fig. 5D, Table 1).

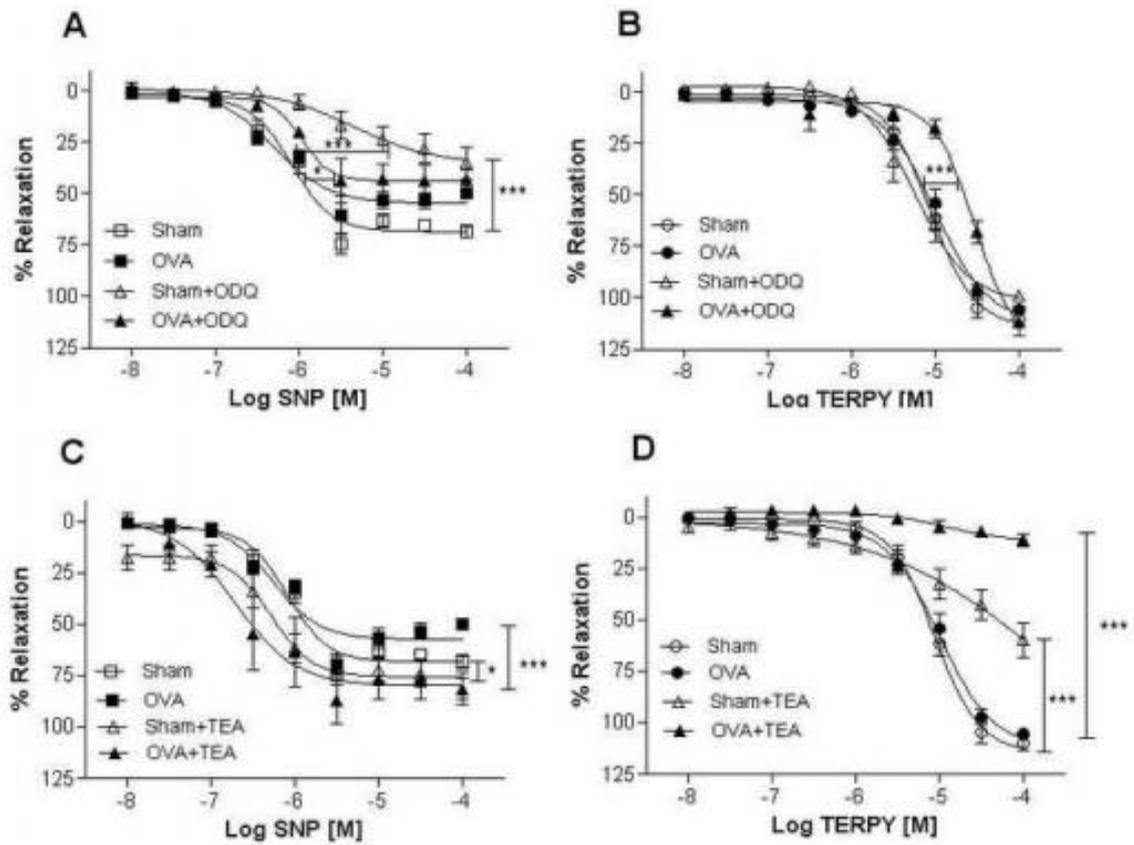


Fig. 4. Relaxant concentration–response curves for SNP (A) and TERPY (B) in Sham and OVA rat tracheas in absence or presence (30 min) of ODQ (1 μ M). SNP-induced (C) and TERPY-induced (D) relaxation were constructed in absence or presence (30 min) of TEA (5 mM) prior to the addition of carbachol (0.5 mM). Each point represents means \pm SEM and expresses the percentage relaxation induced by SNP and TERPY. Statistics * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

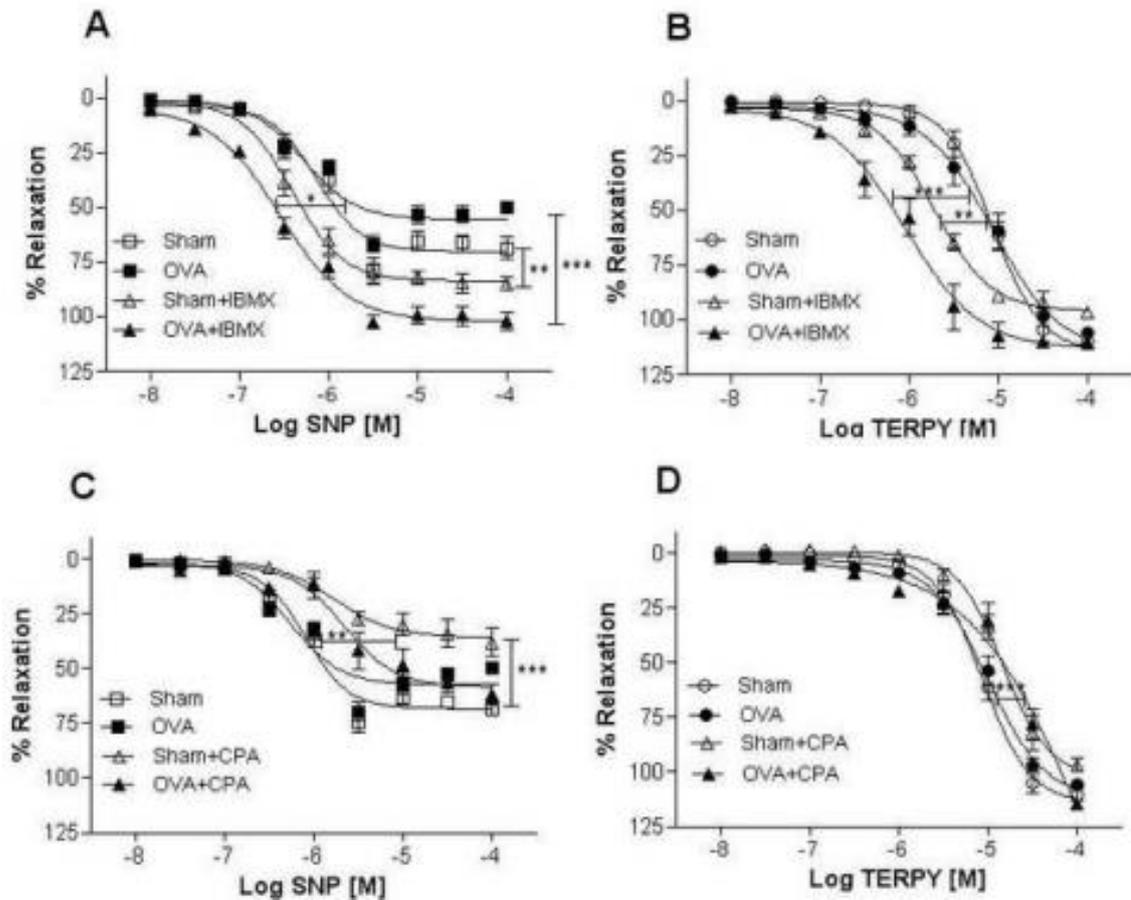


Fig. 5. Relaxant concentration–response curves for SNP (A) and TERPY (B) in Sham and OVA rat tracheas in absence or presence (30 min) of IBMX (10 μ M). SNP-induced (C) and TERPY-induced (D) relaxation were constructed in absence or presence (30 min) of CPA (10 μ M) prior to the addition of carbachol (0.5 mM). Each point represents means \pm SEM and expresses the percentage relaxation induced by SNP and TERPY. Statistics * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

3.5. Effect of TERPY and SNP on extracellular Ca^{2+} -induced contractions

Cumulative additions of $CaCl_2$ in the bath solution produced concentration-dependent tracheal smooth muscle contractions in the presence of carbachol (Fig. 6).

In the Sham group, the Ca^{2+} influx led to contractions of $118.0 \pm 6.0\%$ ($n=5$) in control preparations. The treatment with SNP (100 μ M for 20 min) caused a reduction of approximately 35% in the maximum contraction ($77.0 \pm 9.6\%$, $n=5$, $p < 0.001$) while treatment with TERPY (100 μ M for 20 min) significantly

reduced the contraction by approximately 77% compared with the control ($27.0 \pm 4.1\%$, $n=4$, $p<0.001$).

In the OVA group, the Ca^{2+} influx led to a contraction of $123.7 \pm 76\%$ ($n=5$) in control preparations. The treatment with SNP ($100 \mu\text{M}$ for 20 min) caused a reduction of approximately 32% in the maximum contraction (84.1 ± 7.4 , $n=5$, $p<0.001$) while treatment with TERPY ($100 \mu\text{M}$ for 20 min) completely eliminated the contraction stimulated by Ca^{2+} influx ($-1.6 \pm 2.1\%$, $n=4$, $p<0.001$).

These results suggest that for the two NO-donors blocking the Ca^{2+} influx is an effective mechanism for promoting relaxation of the tracheal smooth muscle, in both the Sham and OVA groups. Moreover, TERPY seems to be more effective than SNP in inhibiting this Ca^{2+} influx in asthmatic rats.

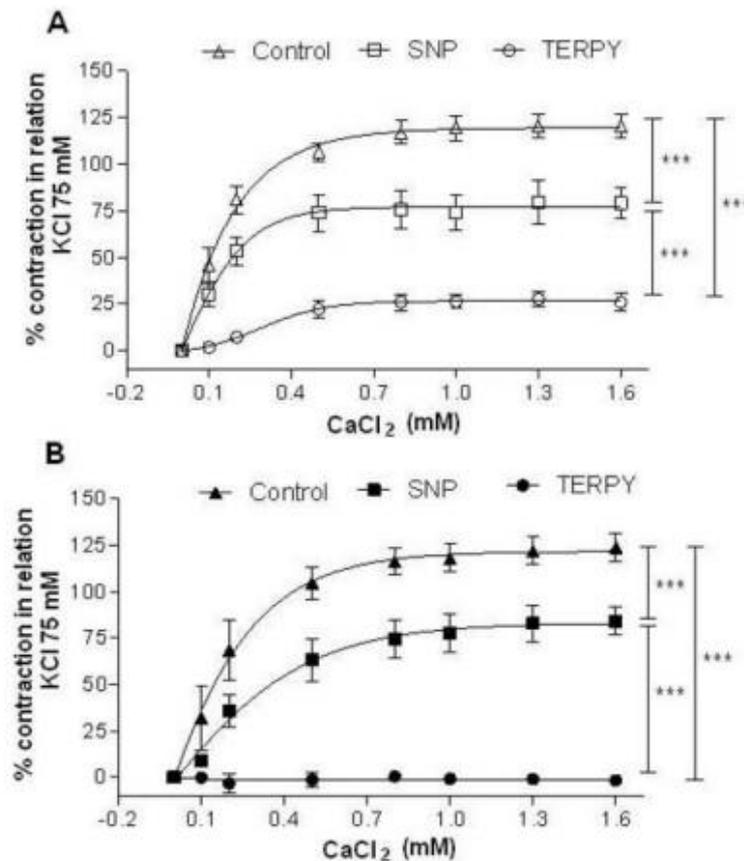


Fig. 6. Contraction-response curves for extracellular Ca^{2+} (CaCl_2) in Sham (A) and OVA (B) groups in presence of $0.5 \mu\text{M}$ carbachol in Ca^{2+} -free Krebs solution in the absence (Control) or presence (20 min) of SNP or TERPY (both $100 \mu\text{M}$). Each point represents the mean \pm SEM and expresses as maximal change from the contraction exerted by 75 mM KCl, which was taken as 100%. Statistics *** $p < 0.001$.

3.6. Bronchiolar relaxation induced by TERPY

Fig. 7A shows the bronchoalveolar slice of the asthmatic animal with an initial area of $14,456.36 \mu\text{m}^2$ before adding carbachol. Fig. 7B shows the contraction 180s after stimulation by carbachol ($0.5 \mu\text{M}$) with an area of $11,603.65 \mu\text{m}^2$ while Fig. 7C represents the relaxation induced by TERPY ($100 \mu\text{M}$) 360s after the carbachol-induced contraction (final area of $13,196.14 \mu\text{m}^2$). The average contraction induced by carbachol in the bronchoalveolar slices was $17.6 \pm 4.9\%$ and the relaxation provoked by TERPY was $28.3 \pm 13.2\%$ ($n=4$, $p<0.01$) (Fig. 7D).

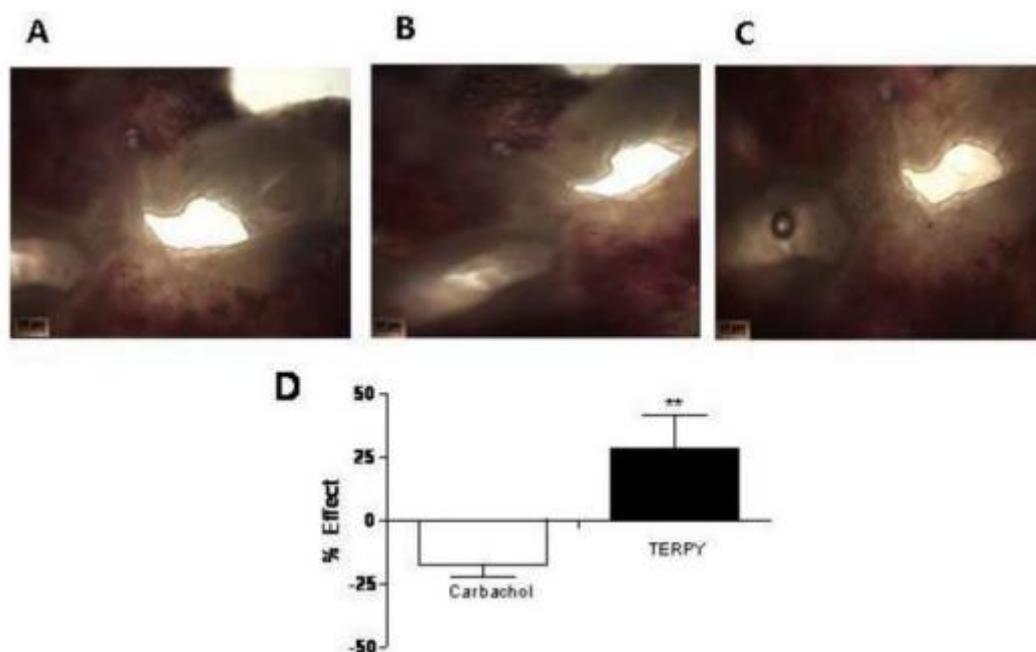


Fig.7. Photomicroscopy are transverse slices of asthmatic bronchioles. The images show cuts (approximately 1 mm) before (A) the addition of carbachol with an area of $14456.36 \mu\text{m}^2$; 180s after addition of carbachol (B) with an area of $11603.65 \mu\text{m}^2$ and TERPY relaxation (C) 180s after addition of carbachol with an area of $13196.14 \mu\text{m}^2$. (D) represents the percentage contraction exerted by carbachol (180s) and TERPY-induced relaxation (360s) in asthmatic bronchiole slices ($n=4$). Statistics $**p<0.01$.

Table 1: E_{max} (% relaxation) and pD_2 (potency) for SNP and TERPY in Sham and OVA rat tracheas in absence (control) or presence of different pharmacological tools.

	SNP Sham		SNP OVA	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Control	68.3 ± 3.1%, n=9	6.1 ± 0.07, n=9	49.9 ± 2.7%, n=6	6.2 ± 0.06, n=6
ODQ	35.0 ± 7.7%, n=7***	5.2 ± 0.22, n=7***	42.8 ± 4.7%, n=4	5.9 ± 0.04, n=4*
TEA	81.6 ± 5.2%, n=9 *	6.3 ± 0.09, n=9	81.5 ± 7.9%, n=5***	6.2 ± 0.26, n=5
IBMX	84.9 ± 3.0%, n=4**	6.3 ± 0.04, n=4	101.9 ± 4.1%, n=4***	6.5 ± 0.05, n=4*
CPA	38.9 ± 6.6%, n=4***	5.8 ± 0.07, n=4**	62.1 ± 4.8%, n=4	5.8 ± 0.22, n=4
	TERPY Sham		TERPY OVA	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Control	110.2 ± 3.2%, n=9	5.1 ± 0.06, n=9	106.1 ± 1.5%, n=9	5.0 ± 0.09, n=9
ODQ	98.7 ± 1.3%, n=5	5.2 ± 0.10, n=5	109.0 ± 8.2%, n=4	4.4 ± 0.08, n=4 ***
TEA	48.3 ± 2.7%, n=7***	4.9 ± 0.18, n= 7	14.0 ± 1.7%, n=4***	4.9 ± 0.30, n=4
IBMX	96.8 ± 1.5%, n=5	5.5 ± 0.19, n= 5**	111.2 ± 2.1%, n=4	6.0 ± 0.13, n=4***
CPA	96.9 ± 3.0%, n=4	4.9 ± 0.04, n= 4	114.2 ± 1.5%, n=4	3.9 ± 0.21, n= 4***

Values are mean ± SEM. Significant difference when compared to control of each group (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001).

4. Discussion

Nitric oxide is a major factor in the regulation of different physiological and pathological processes including airway smooth muscle relaxation. For many years NO-donors have been recognized as inducing bronchial relaxation in animals and humans (Elmedal et al., 2005; Janssen et al., 2000). The intracellular mechanism through which NO provokes relaxation in the airways occurs dependently or independently of the cGMP (Ay et al., 2006) or through membrane hyperpolarization K^+ (Castro et al., 2011; Toque et al., 2010). This study contributes to the discussion on the effects of NO on the airway smooth muscle and on the use of a promising new NO-donor compound (TERPY) in the isolated airways of asthmatic and healthy rats.

Treatment with OVA is the classic model for inducing experimental asthma in rodents. It is a purified egg protein extensively used as an allergen and is known to cause occupational asthma. OVA-sensitization leads to inflammation

and recruits cells, such as eosinophils, mast cells, lymphocytes and neutrophils, and is hyper-responsive to constrictor agonists (Eum et al., 1999; Kucharewicz et al., 2008). The histological findings on the trachea in this present study showed that OVA triggered an inflammatory process associated to intense cell migration in the tracheal tissue, when compared to the control. Such findings were shown by the increased reactivity of the smooth muscle (tracheal reactivity) to the muscarinic agonist carbachol, similar to that described in human patients with asthma (Chung et al., 2014; Kucharewicz et al., 2008).

Both NO-donors studied caused concentration-dependent relaxation in both the asthmatic and healthy rat tracheas. The TERPY was more effective than SNP and presented similar relaxation levels in both groups of animals, leading to full relaxation. Thus, we can state that the asthma condition did not alter the pharmacological parameters of relaxation induced by TERPY. Our results with SNP corroborate previous studies in which this drug only induced a half-relaxation in airways (Castro et al., 2011; Toque et al., 2010; Vaali et al., 2000). On the other hand, the asthma condition inhibited further relaxation, which indicated that the inflammatory process could reduce the relaxing effect of SNP. Our experiments have shown that the new NO-donor TERPY induces 100% relaxation in rat trachea, irrespective of the presence of asthma, which could be a major advantage in relation to the other NO-related drugs.

The NO activation of sGC induces the generation of cGMP, which activates protein kinase G (PKG) and leads to bronchodilations (Toque et al., 2010). However, in asthmatic patients, this bronchodilation is impaired even when large amounts of NO are used (Dupont et al., 2014). In our study, the inhibition of sGC by ODQ in healthy trachea caused a significant reduction in SNP-induced relaxation. On the other hand, in asthmatic trachea the ODQ presented only a mild alteration in potency. This result suggests that asthma reduced the participation of the sGC/cGMP pathway in the SNP-induced relaxation. These data corroborate earlier findings, which have demonstrated that the sGC/cGMP pathway is impaired in asthma patients (Bousquet et al., 2000; Papapetropoulos, 2006). Interestingly, the inhibition of sGC did not alter the pharmacological parameters of the TERPY in healthy tracheal smooth muscle and only caused a reduction in potency in asthmatic tracheas. A

possible explanation is that the relaxation induced by NO can also occur through cGMP-independent mechanisms and this seems to be the major route by which the TERPY leads to relaxation in healthy tracheas causing, for example, activation of K⁺ channels.

The relaxing effect of TERPY after K⁺ channel blocking (using TEA) was largely reduced in both healthy and asthmatic groups, which suggests the participation of K⁺ channels in this effect. Moreover, the TEA almost completely eliminated the TERPY-induced relaxation in asthmatic tracheas, which shows the greater participation of its cellular pathways in this group. In contrast, these channels do not seem to be significant for SNP-induced relaxation. It is difficult to explain (and this study did not set out to do so) the unexpected effect of TEA on SNP-induced relaxation in both groups.

Literature data show that TEA can exert secondary effects, such as the direct activation of gap junctions in different tissues including tracheas (Kannan and Daniel, 1978; Watts et al., 1994). Direct cell-to-cell communication along the muscular tissue is governed by gap junctions, facilitating the production of coordinated multicellular responses (Christ, 1995; Rocha et al., 2008). Some studies have also shown that NO, through the cGMP/PKG pathway, regulates and further increases gap junction communications (Gönczi et al., 2009; Lampe and Lau, 2004). Since gap junctions mediate the spread of ions and second messengers, such as cGMP, from one cell to another (Kanaporis et al., 2008; Kumar and Gilula, 1996), an increase in gap junction coupling should enhance diffusion potential, thereby leading to the direct activation of a greater fraction of smooth muscle cells in the preparation (Christ, 1995; Kenakin, 1980). Christ et al. (1994), have proposed that NO-induced dilation in peripheral tissues is dependent on the cell-to-cell diffusion of cGMP through the gap junction. The effect of TEA potentiating NO-induced relaxation was not seen for TERPY, because for it, the cGMP/PKG pathway is not being recruited, unlike SNP. Although we consider that these hypotheses are reasonable, we cannot here declare the real mechanism by which TEA increases the relaxant effect of SNP.

The results with IBMX, the non-selective PDE inhibitor, reinforce the hypothesis that the sGC/cGMP pathway participates to a large extent in the relaxation induced by SNP in the tracheas of both healthy and asthmatic rats.

Since IBMX reduces degradation of the cGMP, an increase in the efficacy of SNP was to be expected and was observed in both groups. However, IBMX provoked an increase only in the potency of the TERPY in both groups. These results are in consonance with the data obtained after the sGC inhibition, using ODQ.

Intracellular Ca^{2+} concentration is responsible for determining tone in tracheal smooth muscle and several studies have shown that reticular Ca^{2+} -ATPase (SERCA), which can be inhibited by cyclopiazonic acid (CPA), is involved in NO-smooth muscle relaxation (Bazán-Perkins, et al., 2012; Janssen et al., 2000). For SNP, we observed that the inhibition of SERCA reduced relaxation in healthy tracheas only, which shows that SNP can activate the SERCA. However, in the asthmatic group, the CPA treatment did not modify the SNP-induced relaxation, which suggests that the asthma condition could have desensitized the SERCA. In the physiological conditions, the SERCA activation is triggered by the sGC/cGMP pathway (Bazán-Perkins, 2012). Since the sGC/cGMP pathway could possibly be of secondary importance in the asthma condition, the SERCA inhibition did not change the relaxation induced by SNP. These results are also in consonance with the data obtained after the sGC inhibition, using ODQ. Unlike SNP, the treatment with CPA did not change the TERPY-induced relaxation in healthy tracheas, although it reduced the TERPY potency in asthmatic tracheas. This result along with the data obtained after sGC inhibition (using ODQ) suggest that the sGC/cGMP pathway could be a new mechanism by which TERPY leads to the relaxation of asthmatic tracheas. Apparently this pathway is not part of the relaxation in healthy trachea.

In airway smooth muscle, the extracellular Ca^{2+} influx is crucial to intracellular Ca^{2+} rise during the contraction phase and can be stimulated by a muscarinic agonist (Du et al., 2005; Tazzeo et al., 2008). Several different mechanisms for NO-induced inhibition of the Ca^{2+} influx through the plasmatic membrane have been proposed, including inhibition by cGMP-dependent mechanisms (Blatter and Wier, 1994) or by membrane hyperpolarization due to direct (Bolotina, et al., 1994) or indirect cGMP-dependent activation of K^+ channels (Ay et al., 2006). Our experiments also showed the importance of NO-induced extracellular Ca^{2+} influx inhibition in both healthy and asthmatic

rat tracheas. We found that both SNP and TERPY are capable of inhibiting the contraction provoked by extracellular Ca^{2+} influx stimulated by an agonist, which could contribute to the relaxant effect of these drugs. TERPY, however, was more effective than SNP in promoting this inhibition in both healthy and asthmatic tracheas. In the case of asthma, the TERPY totally inhibited the contraction induced by the Ca^{2+} influx. Using these results as a basis, we can suggest that TERPY mediates relaxation through mechanisms which alter the mobilization or sensitivity to extracellular Ca^{2+} , principally in asthmatic rats.

The airways undergo contraction in the presence of a cholinergic stimulus and such an effect can vary according to the anatomical site, when one considers that the bronchioles are more responsive than the proximal bronchial airways (Kott et al., 2002). Our results demonstrated that while carbachol caused bronchoconstriction and reduced the area, TERPY was able to reverse the contraction and induce bronchodilation.

In summary, the new NO-donor TERPY is more effective in inducing relaxation in both asthmatic and healthy rat tracheas than the SNP. In healthy trachea, in contrast to SNP, NO released from the ruthenium complex, induces airway smooth muscle relaxation through cGMP-independent mechanisms and appears to involve Ca^{2+} and K^{+} fluxes across the membrane, which leads to decreased cytosolic Ca^{2+} concentrations. In asthmatic tracheas, in addition to these mechanisms, TERPY also provoked relaxation through activation of the sGC/cGMP pathway. SNP-induced relaxation in asthmatic and healthy tracheas also appears to involve Ca^{2+} and K^{+} fluxes across the membrane and activation of NO/sGC/cGMP pathways. However, the activation of sGC pathways appears to be reduced in airway inflammation, as is the role of SERCA, which further impairs the relaxing effect of the SNP.

Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

Conflict of interest: none declare.

References

- Araújo, A.V., Pereira, A.C., Grando, M.D., da Silva, R.S., Bendhack, L.M., 2013. The new NO donor Terpy induces similar relaxation in mesenteric resistance arteries of renal hypertensive and normotensive rats. *Nitric Oxide* (35), 47-53.
- Ay, B., Iyanoye, A., Sieck, G.C., Prakash, Y.S., Pabelick, C.M., 2006. Cyclic nucleotide regulation of store-operated Ca²⁺ influx in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290 (2), L278–L283.
- Bazán-Perkins, B., 2012. cGMP reduces the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in airway smooth muscle cells: a putative mechanism in the regulation of Ca²⁺ by cGMP. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 32 (6), 375-82.
- Blatter, L.A., Wier, W.G., 1994. Nitric oxide decreases [Ca²⁺]_i in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium* 15 (2) 122-131.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., Cohen, R.A., 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368 (6474), 850-853.
- Bonaventura, D., de Lima, R.G., Vercesi, J.A., da Silva, R.S., Bendhack, L.M., 2007. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. *Vascul. Pharmacol.* 46 (3), 215-222.
- Bousquet, J., Jeffery, P., Busse, W., Johnson, M., Vignola, A.M., 2000. Asthma from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 161 (5), 1720 –1745.
- Castro, P.F.S., Pereira, A.C., Rodrigues, G.J., Batista, A.C., da Silva, R.S., Bendhack, L.M., et al., 2011. A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of airway smooth muscle. *Eur. J. Pharm. Scie.* (43), 370-377.
- Christ, G.J., 1995. Modulation of alpha 1-adrenergic contractility in isolated vascular tissues by heptanol: a functional demonstration of the potential importance of intercellular communication to vascular response generation. *Life Sci.* 56 (10), 709–721.
- Christ, G.J., Brink, P.R., Ramanan, S.V., 1994. Dynamic gap junctional communication: a delimiting model for tissue responses. *Biophys. J.* 67 (3), 335–344.
- Chung, K.F., Wenzel, S.E., Brozek, J.L., Bush, A., Castro, M., Sterk, P.J., et al., 2014. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J.* 43 (2), 343-73.
- de Gaitani, C.M., de Melo, M.C.C., Lunardi, C.N., Oliveira F.S., da Silva, R.S., Bendhack, L.M., 2009. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. *Nitric Oxide* (20), 195–199.
- de Lima, R.G., Sauaia, M.G., Bonaventura, D., Tedesco, A.C., Bendhack, L.M., da Silva, R.S., 2006. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(tpy)NO]₃⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. *Inorg. Chim. Acta.* (359), 2543–2549.

- Du, W., Stiber, J.A., Rosenberg, P.B., Meissner, G., Eu, J.P., 2005. Ryanodine receptors in muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction. *J. Biol. Chem.* 280, 26287–26294.
- Dupont, L.L., Glynos, C., Bracke, K.R., Brouckaert, P., Brusselle, G.G., 2014. Role of the nitric oxide–soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. *Pulm Pharmacol Ther.* 29 (1), p. 1-6.
- Elmedal, B., Mulvany, M.J., Simonsen, U., 2005. Dual impact of a nitric oxide donor, GEA 3175, in human pulmonary smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 516 (1), 78-84.
- Eum, S.Y., Norel, X., Lefort, J., Labat, C., Vargaftig, B.B., Brink, C., 1999. Anaphylactic bronchoconstriction in BP2 mice: interactions between serotonin and acetylcholine. *Br J Pharmacol.* 126 (1), 312–316.
- Gönczi, M., Papp, R., Kovács, M., Seprényi, G., Végh, A., 2009. Modulation of gap junctions by nitric oxide contributes to the anti-arrhythmic effect of sodium nitroprusside? *Br. J. Pharmacol.* 156, 786–793.
- Janssen, L.J., Premji, M., Lu-Chao, H., Cox, G., Keshavjee, S., 2000. NO(+) but not NO radical relaxes airway smooth muscle via cGMP-independent release of internal Ca(2+). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278 (5), L899-905.
- Kanaporis, G., Mese, G., Valiuniene, L., White, T.W., Brink, P.R., Valiunas, V., 2008. Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. *J. Gen. Physiol.* 131 (4), 293–305.
- Kanikadan, P.Y.D., Sertié, J.A.A., Oliveira-Filho, R.R., Lima, W.T., 2008. Protector mechanisms of the association between gastroesophageal reflux disease and asthma: experimental study in rats. *Arq. Gastroenterol.* 45 (3), 243-8.
- Kannan, M.S., Daniel, E.E., 1978. Formation of gap junctions by treatment in vitro with potassium conductance blockers. *J. Cell Biol.* 78, 338–348.
- Kenakin, T.P., 1980. On the importance of agonist concentration-gradients within isolated tissues. Increased maximal responses of rat vasa deferentia to noradrenaline after blockade of neuronal uptake. *J. Pharm. Pharmacol.* 32, 833–838.
- Kott, K.S., Pinkerton, K.E., Bric, J.M., Plopper, C.G., Avadhanam, K.P., Joad, J.P., 2002. Methacholine responsiveness of proximal and distal airways of monkeys and rats using videomicroscopy. *J Appl Physiol.* 92 (3), 989-96.
- Kucharewicz, I., Bodzenta-Lukaszyk, A., Buczko, W., 2008. Experimental asthma in rats. *Pharmacol Rep.* (60), 783–788.
- Kumar, N.M., Gilula, N.B., 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84 (3), 381–388.
- Lampe, P.D., Lau, A.F., 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (7), 1171–1186
- Li, D., Shirakami, G., Zhan, X., Johns, R.A., 2000. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23 (2), 175–181.
- Lunardi, C.N., Vercesi, J.A., da Silva, R.S., Bendhack, L.M., 2007. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-

- [Ru(Cl)(bpy)₂(NO)](PF₆) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. *Vascul. Pharmacol.* 47 (2-3), 139-144.
- McIntyre, M., Bohr, D.F., Dominiczak, A.F., 1999. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* (34), 539-45.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* (7), 145–173.
- Munhoz, F.C., Potje, S.R., Pereira, A.C., Daruge, M.G., da Silva, R.S., Bendhack, L.M., et al., 2012. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor [Ru(terpy)(bdq)NO]⁺₃ in spontaneously hypertensive rats. *Nitric oxide* (26), 111-117.
- Papapetropoulos, A., Simoes, D.C., Xanthou, G., Roussos, C., Gratziou, C., 2006. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290 (1), L179-L184.
- Paulo, M., Rodrigues, G.J., da Silva, R.S., Bendhack, L.M., 2012. A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar artery. *Eur. J. Pharm. Sci.* (45), 344-350.
- Rocha, L.M., Kihara, A.H., Davel, A.P., Britto, L.R.G., Rossoni, L.V., Bendhack, L.M., 2008. Blood pressure variability increases connexin expression in the vascular smooth muscle of rats. *Cardiovasc. Res.* 80 (1), 123–130.
- Rose, F., Guthmann, B., Tenenbaum, T., Fink, L., Ghofrani, A., Weissmann, N., et al., 2002. Apical, but not basolateral, endotoxin preincubation protects alveolar epithelial cells against hydrogen peroxide-induced loss of barrier function: the role of nitric oxide synthesis. *J. Immunol.* 169 (3), 1474–1481.
- Tazzeo, T., Zhang, Y., Keshavjee, S., Janssen, L.J., 2008. Ryanodine receptors deplete internal Ca²⁺ store in human and bovine airway smooth muscle. *Eur. Respir. J.* 32 (2), 275–284.
- Toque, H.A., Monica, F.Z., Morganti, R.P., De Nucci, G., Antunes, E., 2010. Mechanisms of relaxant activity of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in rat tracheal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 645 (1-3), 158-164.
- Vaali, K., Li, L., Lähteenmäki, T., Vapaatalo, H., 2000. Role of BKCa channels and cyclic nucleotides in synergistic relaxation of trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 399, 75–84.
- Watts, S.W., Tsai, M.L., Loch-Caruso, R., Webb, R.C., 1994. Gap junctional communication and vascular smooth muscle reactivity: use of tetraethylammonium chloride. *J. Vasc. Res.* 31, 307–313.
- Yakazu, Y., Iwasawa, K., Narita, H., Kindscher, J.D., Benson, K.T., Goto, H., 2001. Hemodynamic and sympathetic effects of fenoldopam and sodium nitroprusside. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 45 (9), 1176-1180.