

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

Patrícia Ferreira da Silva Castro

Estudo do efeito relaxante de um novo composto doador de óxido  
nítrico em preparações de traquéias isoladas de ratos

Goiânia  
2011

Patrícia Ferreira da Silva Castro

Estudo do efeito relaxante de um novo composto doador de óxido  
nítrico em preparações de traquéias isoladas de ratos

Dissertação de mestrado apresentada à  
Faculdade de Farmácia da UFG como  
parte dos requisitos para a obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Farmacêuticas  
Área de concentração: Fármacos e  
Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Matheus L. Rocha

Goiânia

2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

Castro, Patrícia Ferreira da Silva

Estudo do efeito relaxante de um novo composto doador de óxido nítrico em preparações de traquéias isoladas de ratos [manuscrito] / Patrícia Ferreira da Silva Castro. - 2011. xv, 84 'f'. : il., figs.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Matheus Lavorenti Rocha  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Faculdade de Farmácia, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviações.

1. Óxido nítrico 2. Complexo nitrosilado de rutênio 3.  
traquéia I. Título.

*Natan,  
A quem amo mais que a mim mesma.*

## SINCEROS AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir o privilégio de desvendar uma pequenina parte de sua tão grandiosa criação, ser meu sustento, força e fonte de inspiração;

Ao Natan por fazer parte da minha vida cuidando, incentivando e amando;

Aos meus pais, Dário e Tininha e minha vizinha Alícia, pelo carinho e apoio irrestrito;

À minha irmã Sâmela pelo ombro amigo, apoio e torcida;

Ao Prof. Dr. Matheus L. Rocha por acreditar no meu trabalho, contribuir para o meu crescimento e, de fato, ser orientador;

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia pela convivência e auxílio;

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia e à Faculdade de Farmácia pela parceria e por proporcionar as condições de trabalho;

Ao Laboratório de Farmacologia da USP Ribeirão Preto pela receptividade e disposição em contribuir para esse trabalho;

Ao CNPq por fazer desse projeto realidade;

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

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

*“Irei ensinando pouco a pouco. Não direi se é longe ou perto. Só direi que fica do lado de lá do rio. Mas nada temam, pois sou eu o grande Construtor de Pontes. Venham.”*

*C. S. Lewis*

## RESUMO

O presente trabalho avaliou os mecanismos de relaxamento de dois doadores de óxido nítrico (NO), o complexo de rutênio [Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sup>3+</sup> (Terpy) e o nitroprussiato de sódio (NPS) em traquéias isoladas de ratos. A traquéia isolada foi montada em banho para órgãos isolados e contraída com carbacol para estudo do relaxamento. O efeito relaxante do Terpy e do NPS foi avaliado em concentrações crescentes e cumulativas (10 nM a 100 µM). Foi verificada a participação dos diferentes tipos de canais de K<sup>+</sup>, a participação da via GCs/GMPc, a inibição da COX (pela indometacina) e das PDEs (pelo IBMX), a influência do epitélio, a participação dos estoques internos de Ca<sup>2+</sup> assim como a participação do influxo deste íon e o potencial sinergismo dos doadores com terbutalina. Foram feitas análises de microscopia confocal para quantificação da concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup> mobilizada pelos doadores de NO. Como resultados, verificamos que os dois compostos levaram ao relaxamento do músculo liso traqueal de forma concentração-dependente. Entretanto o efeito máximo (E<sub>max</sub>) do Terpy foi maior do que o NPS. O relaxamento estimulado pelo Terpy foi reduzido significativamente sob a pré-contracção com KCl 75 mM. Bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> como tetraetilamônio, BaCl<sub>2</sub>, glibenclamida e 4-aminopiridina reduziram significativamente o relaxamento estimulado pelo Terpy, apesar da iberiotoxina e apamina não alterarem a resposta. O ODQ (inibidor da GCs) somente reduziu o efeito relaxante do NPS e o IBMX aumentou seu E<sub>max</sub>, sendo que ambos inibidores não apresentaram efeito para o Terpy. A indometacina não alterou o padrão de resposta para ambos doadores. A retirada do epitélio reduziu o efeito relaxante somente para o NPS, não alterando o padrão de relaxamento para o Terpy. A inibição da Ca<sup>2+</sup>-ATPase reticular (pela taspigargina) e da captação de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial (pelo ruthenium red) não modificaram o perfil de relaxamento para ambos doadores testados. Em relação ao efeito sinérgico estudado, não foi observado benefício com a adição dos doadores sobre o efeito relaxante da terbutalina. A medida da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> revelou que o Terpy é capaz de reduzir a concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> de forma mais pronunciada que o NPS. Os resultados apresentados neste trabalho levam a concluir que o mecanismo pelo qual o Terpy leva ao relaxamento do músculo liso traqueal de ratos está associado à diminuição da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>, e este mecanismo pode estar relacionado à ativação dos canais de K<sup>+</sup> do tipo K<sub>v</sub>, K<sub>IR</sub> e K<sub>ATP</sub> e ao influxo de Ca<sup>2+</sup>. Para o NPS, o mecanismo mais importante que leva ao relaxamento parece ser através da ativação da via GCs/GMPc, além do envolvimento dos canais para K<sup>+</sup> do tipo K<sub>IR</sub> e SK<sub>Ca</sub>.

**Palavras chaves:** Óxido Nítrico, complexo nitrosilados de rutênio, traquéia, relaxamento, canais para potássio, guanilato ciclase solúvel.

## ABSTRACT

This study evaluated the mechanisms of relaxation of two nitric oxide (NO) donors, ruthenium complex [Ru(terpy)(bdq)NO<sup>+</sup>]<sub>3</sub><sup>+</sup> (Terpy) and sodium nitroprusside (SNP) in isolated trachea of rats. The isolated trachea was sectioned into rings and contracted with carbachol in an organ chamber. 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<sup>+</sup> channels, the importance of sGC/cGMP pathway, the inhibition of COX and PDEs, the influence of the extra and intracellular Ca<sup>2+</sup> sources and the influence of the epithelium on the relaxing response. The synergism between NO-donor and β-adrenoceptor agonist terbutaline was also verified. Additionally, we have used confocal microscopy in order to analyze the effect of the donors on cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration. We have verified that both compounds led to the relaxation of tracheal smooth muscle preparations in a dependent-concentration mode. However, the maximum effect (E<sub>max</sub>) induced by Terpy was higher than the effect of SNP. However, the Terpy effects were significantly reduced by pre-contraction with 75 mM KCl. K<sup>+</sup> channel blockers like the tetraethylammonium, glybenclamide, BaCl<sub>2</sub> and 4-aminopyridine reduced the relaxation to Terpy, while iberiotoxin and apamin did not modify this response. SNP-induced relaxation was significantly reduced by pretreatment with ODQ (sGC inhibitor). On the IBMX (non-selective PDEs inhibitor) increased the relaxation only to SNP. The response to both NO-donors was not altered by indomethacin, thapsigargin (reticular Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitor) or ruthenium red (a mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter inhibitor). The epithelium removal reduced the relaxation only to SNP, and it had no effects on Terpy. In relation to synergic effect of the association of NO-donors and terbutaline, we did not observe any additive effect in the relaxation induced by terbutaline. Terpy was more effective than SNP in reducing the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration measured by confocal microscopy. In conclusion, these results have shown that Terpy induces airway smooth muscle relaxation by cGMP-independent mechanisms. It involves Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes (mainly via K<sub>v</sub>, K<sub>ir</sub> and K<sub>ATP</sub> channels) across the membrane, and it is more effective in reducing cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and inducing relaxation in the rat trachea than the SNP. In relation to SNP, the most important relaxation pathway seems to be related to sGC/cGMP pathway and activation of K<sub>ir</sub> and SK<sub>Ca</sub> channels.

**Keywords:** Nitric oxide, nitrosyl ruthenium complex, trachea, relaxation, K<sup>+</sup> channels and guanylate cyclase.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Curva de tensão em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 2: Efeito contrátil do carbacol em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 3: Efeito relaxante do NPS em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 4: Efeito relaxante do Terpy em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 5: Comparação entre o efeito relaxante do NPS e do Terpy em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com carbacol.
- Figura 6: Comparação entre o efeito relaxante máximo do Terpy e do NPS.
- Figura 7: Comparação entre a potência do Terpy e a do NPS.
- Figura 8: Comparação entre o efeito relaxante do NPS e do Terpy em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com KCl 75mM.
- Figura 9: Curvas de comparação entre o efeito relaxante do NPS em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com KCl (75 mM) ou com carbacol.
- Figura 10: Curvas de comparação entre o efeito relaxante do Terpy em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com carbacol ou KCl 75 mM.
- Figura 11: Comparação entre o efeito relaxante máximo do Terpy em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com carbacol ou com KCl 75 mM.
- Figura 12: Efeito da indometacina sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 13: Efeito da indometacina sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 14: Efeito do ODQ sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 15: Efeito máximo do NPS na presença de ODQ.
- Figura 16: Potência do NPS na presença de ODQ.
- Figura 17: Efeito do ODQ sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 18: Efeito do IBMX sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 19: Efeito máximo do NPS na presença de IBMX.

- Figura 20: Potência do NPS na presença de IBMX.
- Figura 21: Efeito do IBMX sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 22: Potência do Terpy na presença de IBMX.
- Figura 23: Efeito do TEA sobre o relaxamento do NPS em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 24: Efeito máximo do NPS na presença de TEA.
- Figura 25: Efeito do TEA sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 26: Efeito máximo do Terpy na presença de TEA.
- Figura 27: Efeito da associação de TEA+ODQ sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 28: Efeito máximo do NPS em presença de TEA+ODQ.
- Figura 29: Efeito da associação de TEA+ODQ sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 30: Efeito máximo do Terpy na presença de TEA+ODQ.
- Figura 31: Potência do Terpy na presença da associação de TEA+ODQ.
- Figura 32: Efeito do BaCl<sub>2</sub> sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 33: Efeito máximo do NPS na presença de BaCl<sub>2</sub>.
- Figura 34: Efeito do BaCl<sub>2</sub> sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 35: Efeito máximo do Terpy na presença de BaCl<sub>2</sub>.
- Figura 36: Potência do Terpy na presença de BaCl<sub>2</sub>.
- Figura 37: Efeito da glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 38: Potência do NPS na presença de glibenclamida.
- Figura 39: Efeito da glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.
- Figura 40: Efeito máximo do Terpy na presença de glibenclamida.
- Figura 41: Potência do Terpy na presença de glibenclamida.

Figura 42: Efeito do 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.

Figura 43: Efeito máximo de NPS na presença de 4-AP.

Figura 44: Potência do NPS na presença de 4-AP.

Figura 45: Efeito do 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.

Figura 46: Efeito máximo do Terpy na presença de 4-AP.

Figura 47: Potência do Terpy na presença de 4-AP.

Figura 48: Efeito da apamina sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.

Figura 49: Efeito máximo de NPS na presença de apamina.

Figura 50: Efeito do apamina sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.

Figura 51: Efeito da iberiotoxina sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.

Figura 52: Efeito do iberiotoxina sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.

Figura 53: Curva de contração para  $\text{Ca}^{2+}$  em presença de carbacol em traquéias isoladas de ratos.

Figura 54: Efeito máximo da curva contração para  $\text{Ca}^{2+}$ .

Figura 55: Curva de contração para  $\text{Ca}^{2+}$  em presença de KCl 75 mM em traquéias isoladas de ratos.

Figura 56: Efeito máximo da curva contração para  $\text{Ca}^{2+}$ .

Figura 57: Efeito da tapsigargina sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.

Figura 58: Efeito da tapsigargina sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.

Figura 59: Efeito do Ruthenium Red sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.

Figura 60: Efeito do Ruthenium Red sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.

Figura 61: Participação do epitélio sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol.

Figura 62: Participação do epitélio no efeito máximo do NPS.

Figura 63: Participação do epitélio sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol.

Figura 64 A e B: Fotomicroscopia de corte histológico transversal de tecido traqueal de rato evidenciando presença (A) e ausência (B) de epitélio de revestimento.

Figura 65: Sinergismo: efeito do NPS sobre o relaxamento induzido pela Terbutalina em traquéias isoladas de ratos.

Figura 66: Sinergismo: efeito do Terpy sobre o relaxamento induzido pela Terbutalina em traquéias isoladas de ratos.

Figura 67: Redução da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  induzido pelo Terpy ou NPS em músculo liso traqueal de ratos.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentração intracelular de Ca <sup>2+</sup>
4-AP	4-Aminopiridina
BaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Bário
COX	Ciclooxigenase
EC <sub>50</sub>	Concentração que promove 50% da resposta máxima
E <sub>max</sub>	Efeito máximo
EPM	Erro padrão da média
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
K <sub>ATP</sub>	Canais de potássio dependentes de ATP
K <sub>Ca</sub>	Canais de potássio ativados por Ca <sup>2+</sup>
KCl	Cloreto de potássio
K <sub>ir</sub>	Canais de potássio tipo retificador
K <sub>v</sub>	Canais de potássio dependentes de voltagem
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
ODQ	1H-[1,2,4]oxidazol[4,3-a]quinoxaline1-one
pD <sub>2</sub>	Potência (-log EC <sub>50</sub> )
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
RS	Retículo sarcoplasmático
TEA	Tetraetilamônio
TERPY	[Ru(terpy)(bdq)NO <sup>+</sup> ] <sup>3+</sup>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
3.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	22
3.2 CURVA DE TENSÃO .....	23
3.3 REATIVIDADE DO MÚSCULO LISO DA TRAQUÉIA .....	24
<b>3.3.1 Curva concentração-efeito para o agonista contrátil carbacol</b> .....	24
<b>3.3.2 Efeito relaxante do Nitroprussiato de Sódio (NPS) e Terpy em anéis de traquéia pré-contraídos com carbacol ou KCl</b> .....	24
<b>3.3.3 Efeito de diferentes inibidores/bloqueadores sobre o relaxamento dos anéis de traquéia desencadeado pelo NPS e pelo Terpy</b> .....	24
<b>3.3.4 Participação dos diferentes tipos de canais de potássio</b> .....	24
<b>3.3.5 Participação do influxo de Ca<sup>2+</sup> em presença de carbacol ou KCl 75 mM</b> .....	25
<b>3.3.6 Efeito da captação de Ca<sup>2+</sup> intracelular pelo retículo sarcoplasmático e pela mitocôndia</b> .....	25
<b>3.3.7 Participação do epitélio</b> .....	26
<b>3.3.8 Avaliação de um possível efeito sinérgico com terbutalina</b> .....	26
3.4 MEDIDAS DA CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE Ca <sup>2+</sup> EM ANÉIS DE TRAQUÉIAS DE RATO POR MICROSCÓPIA CONFOCAL .....	26
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>4 RESULTADOS</b> .....	29
4.1 CURVA DE TENSÃO .....	29
4.2 CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO PARA O AGONISTA CONTRÁTIL CARBACOL ..	29
4.3 EFEITO RELAXANTE DO NPS E DO TERPY EM ANÉIS DE TRAQUÉIAS PRÉ-CONTRAÍDAS COM CARBACOL .....	30
4.4 EFEITO RELAXANTE DO NPS E DO TERPY EM ANÉIS DE TRAQUÉIAS PRÉ-CONTRAÍDAS COM KCl .....	32
4.5 EFEITO DE DIFERENTES INIBIDORES/BLOQUEADORES SOBRE O RELAXAMENTO DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL DESENCADEADO PELO NPS E PELO TERPY ...	34
<b>4.5.1 Efeito do inibidor da ciclooxigenase (indometacina) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia</b> .....	34
<b>4.5.2 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase (ODQ) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia</b> .....	35

<b>4.5.3 Efeito do inibidor das fosfodiesterases (IBMX) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.4 Efeito do bloqueador não-seletivo de canais de potássio (TEA) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5.5 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase (ODQ) associado ao bloqueador não-seletivo de canais de potássio (TEA) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia .....</b>	<b>41</b>
<b>4.6 EFEITO DE DIFERENTES BLOQUEADORES SELETIVOS DE CANAIS DE POTÁSSIO SOBRE O RELAXAMENTO INDUZIDO PELO NPS E PELO TERPY EM TRAQUÉIAS</b>	<b>44</b>
<b>4.6.1 Efeito do bloqueador dos canais de K<sup>+</sup> tipo retificador (K<sub>IR</sub>), BaCl<sub>2</sub> sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia .....</b>	<b>44</b>
<b>4.6.2 Efeito do bloqueador dos canais de K<sup>+</sup> dependentes de ATP (K<sub>ATP</sub>), glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia.....</b>	<b>47</b>
<b>4.6.3 Efeito do bloqueador dos canais de K<sup>+</sup> dependente de voltagem (K<sub>v</sub>), 4-aminopiridina (4-AP) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia.....</b>	<b>49</b>
<b>4.6.4 Efeito do bloqueador dos canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de baixa condutância (SK<sub>Ca</sub>), Apamina (APA), sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6.5 Efeito do bloqueador dos canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de alta condutância (BK<sub>Ca</sub>), Iberiotoxina (IBTX) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia.....</b>	<b>53</b>
<b>4.7 EFEITO DO INFLUXO DE Ca<sup>2+</sup> SOBRE O RELAXAMENTO INDUZIDO PELO NPS E PELO TERPY EM TRAQUÉIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.7.1 Em presença de carbacol.....</b>	<b>54</b>
<b>4.7.2 Em presença de KCl 75 mM .....</b>	<b>56</b>
<b>4.8 EFEITO DA CAPTAÇÃO DE Ca<sup>2+</sup> INTRACELULAR DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO E DA MITOCÔNDIA.....</b>	<b>57</b>
<b>4.9 EFEITO DO EPITÉLIO SOBRE O RELAXAMENTO INDUZIDO PELO NPS E PELO TERPY EM TRAQUÉIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>4.10 AVALIAÇÃO DE UM POSSÍVEL EFEITO SINÉRGICO COM TERBUTALINA.....</b>	<b>62</b>
<b>4.11 MEDIDAS DA CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE Ca<sup>2+</sup> EM ANÉIS DE TRAQUÉIAS DE RATO POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....</b>	<b>63</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Óxido Nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, apresentando um elétron desemparelhado na última camada eletrônica. Até meados da década de 1980, era considerado apenas mais um dos poluentes ambientais indesejáveis e potencialmente carcinogênicos. Uma das funções fisiológicas do NO foi descoberta nos vasos sanguíneos quando foi constatado que o fator de relaxamento derivado do endotélio, descrito por Furchgott & Zawadzki (1980), era o NO produzido pela NO-sintase nas células endoteliais da aorta de coelhos. O NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelular, pois embora se apresente na forma radicalar, este se mostra uma molécula não-carregada, capaz de se difundir para dentro e fora das células e também entre compartimentos celulares.

A biossíntese do NO resulta da oxidação de um dos dois grupamentos aminos da L-arginina, que é convertido em L-citrulina, sendo esta reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS). Essa enzima é um dímero e cada uma das subunidades compreende um domínio redutase para mediar a transferência de elétrons do NADPH para o domínio oxigenase, onde ocorre a produção de  $O_2$  e oxidação da arginina. Entre esses domínios, uma região de ligação de calmodulina controla a ativação da NOS em resposta à ligação aos íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (ALDERTON et al., 2001).

Existem três isoformas da NOS e todas elas são expressas no trato respiratório, inclusive de humanos (GUO et al., 1995; REDINGTON et al., 2006). As isoformas n-NOS (também conhecidas como NOS-1) e e-NOS (também conhecidas 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, i-NOS ou NOS-2, é induzida por estímulo imunológico (GASTON et al., 1994).

A liberação do NO nas células endoteliais do sistema cardiovascular e células epiteliais do sistema respiratório é observada em condições basais, como também após a estimulação com várias substâncias como catecolaminas, vasopressina, bradicinina, serotonina e adenosina. (BUGA et al., 1989; NIJKAMP et al., 1993; BOULANGER & VANHOUTTE, 1997).

O NO é o principal agente vasodilatador endógeno que regula o tônus e a homeostase vascular, além de controlar o fluxo sanguíneo basal (FURCHGOTT, 1999), atuar sobre a contratilidade cardíaca (SHAH, 1996), promover o relaxamento das vias aéreas (ARNOLD et al., 1984), mais especificamente, sobre o músculo liso traqueal (ZHOU & TORPHY, 1991; GASTON et al., 1994; JONES et al., 1994; STUART-SMITH et al., 1994).

As células epiteliais da traquéia, além da sua função como barreira física a patógenos externos, são conhecidas por produzirem diversos mediadores, incluindo vários lipídios, fatores de crescimento e citocinas. A modulação do tônus basal do músculo liso adjacente ao epitélio é atribuída à liberação de fatores de relaxamento derivados do epitélio (RAEBURN et al., 1986; HASHIBA et al., 1999), assim como NO (BUGA et al., 1989; NIJKAMP et al., 1993) e prostaglandinas (TSCHIRHART et al., 1987). A maior fonte de NO nas vias aéreas é o epitélio (FOLKERTS & 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 & 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 (BARNES & BELVISI, 1993). Porém, segundo Buga et al. (1989), o músculo liso da traquéia parece ser um pouco menos responsivo à administração de NO quando comparado à musculatura lisa vascular.

Estudos realizados em músculo liso vascular 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 (ELLIS, 1997). A ativação da GCs pelo NO eleva os níveis intracelulares de GMPc, que atua como um mensageiro intracelular amplificando a resposta celular (ARNOLD et al., 1977; IGNARRO, 1991). O principal alvo do GMPc é a família das proteínas quinases dependentes do GMPc, denominadas PKGs. A ativação da PKG e a consequente fosforilação de várias proteínas constitui uma cascata, que acarreta na redução da concentração citosólica de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (MCDANIEL et al., 1992), desfosforilação da cadeia leve de miosina (MURAD, 1986) e interação com aparato contrátil,

desativando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (KARAKI et al., 1988), além da ativação dos canais para  $\text{K}^+$ , levando à hiperpolarização da membrana e inibição de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L (MIYOSHI et al., 1994).

Entretanto, nem todos os estudos confirmam o papel da via GCs/GMPc/PKG mediando os efeitos relaxantes do NO e alguns autores tem 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  $\text{K}^+$  pelo NO (BOLOTINA et al., 1994; PLANE et al., 1996; STUART-SMITH et al., 1994; MISTRY & GARLAND, 1998; HOMER & WANSTALL, 2000; REDINGTON et al., 2006).

Em particular para contração muscular, as fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser de origem intracelular, extracelular ou ambas. Dessa forma, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  são encontrados em quatro diferentes estoques: extracelular, citoplasmático, mitocondrial e não mitocondrial (retículo sarcoplasmático). O retículo sarcoplasmático é considerado o principal estoque intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (TOMAS et al., 1996).

Entre os trabalhos sobre o 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 e 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 e 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 dos 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). Esses grupos de pesquisa 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 & FOLKERTS, 1995). Ashutosh et al. (2000) demonstraram que o NO na concentração de 25 ppm misturado ao oxigênio pode ser seguramente 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 anti-inflamatórios e doadores de NO pode ser uma ótima modalidade terapêutica no tratamento da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica.

O NO em condições fisiológicas, é muito instável e pode reagir quase que instantaneamente com moléculas que apresentem elétrons desemparelhados (MCINTYRE et al., 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 segundos) (NISHIDA et al., 1992). Desta forma, existe um grande interesse em compostos químicos que possam servir de veículo para a liberação de NO nos sistemas biológicos (ARNOLD et al., 1984; SCHAFER et al., 1989; WORKS et al., 2002; NAPOLI et al., 2004).

Uma alternativa para aumentar a biodisponibilidade do NO é a utilização de doadores de NO. Apesar de seus inconvenientes, 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 & 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 (NPS), possuem importantes limitações em seu uso que se contrapõem aos seus benefícios. As células endoteliais e musculares lisas metabolizam a nitroglicerina a NO (FEELISH & KELM, 1991). Contudo, em estudos *in vivo*, o tratamento crônico com este fármaco acarreta em um

fenômeno denominado tolerância. Essa tolerância é caracterizada por uma perda do efeito relaxante e conseqüentemente dos seus efeitos clínicos.

Assim como a nitroglicerina, o NPS requer metabolização catalisada por enzimas presentes na membrana plasmática para liberar o NO (BATES et al., 1991). A liberação de NO pelo NPS é acompanhada pela liberação de cianeto como produto de biotransformação deste doador de NO, o qual apresenta alta toxicidade ao organismo (ARNOLD et al., 1984; BATES et al., 1991). Além da formação de cianeto, a administração endovenosa de NPS leva a em rápida e intensa queda da pressão arterial, com conseqüente taquicardia reflexa (YAKAZU et al., 2001). Estes efeitos são importantes fatores limitantes do uso terapêutico deste doador de NO, restringindo seu uso a condições hospitalares por exigirem suporte de emergência, principalmente devido à sua intensa vasodilatação e súbita queda da pressão arterial.

Lamarque & Whittle (1995) observaram que o NPS está envolvido na formação de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e Villa et al. (1994) relataram que esse ânion reage com o NO liberado pelo próprio NPS formando peroxinitrilo ( $ONOO^-$ ). 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 NPS, alguns metalonitrosil-complexos tem sido utilizados como doadores de NO (WANG et al., 2000).

Dentre os compostos amplamente estudados, que são capazes de liberar NO, estão os complexos nitrosilos 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 (WANG et al., 2000; BONAVENTURA et al., 2004, 2007; LUNARDI et al., 2007; de GAITANI et al., 2009). 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 a ação sobre vasos isolados e pressão arterial em experimentos *in vivo* (BONAVENTURA et al., 2004; de GAITANI et al., 2009).

Já foi verificado por esse 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 íon hidroxil

(NO<sup>-</sup>). Este relaxamento é menos potente que o relaxamento induzido pelo NPS, mas apresenta a mesma eficácia e envolve a ativação dos canais para K<sup>+</sup> 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 o NPS (de LIMA et al., 2006).

Diante do interesse biológico/medicinal deste novo protótipo candidato a fármaco doador de NO, foi estabelecido um trabalho de parceria entre o Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFG e o Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, onde a hipótese deste trabalho é de que o composto doador de NO, Terpy, seja capaz de provocar relaxamento em células musculares lisas das vias aéreas superiores. Parte deste estudo se propõe a caracterizar estes efeitos e comparar com o doador de NO tradicionalmente usada na clínica médica, NPS, verificando possíveis vantagens relacionadas ao uso, além de apontar o mecanismo de ação do novo composto em músculo liso não vascular.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar os mecanismos celulares envolvidos no relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos e comparar esses mecanismos com os do fármaco padrão doador de NO, NPS.

Foram realizados estudos farmacológicos para verificar a possível atividade biológica do complexo pela ocorrência do relaxamento em anéis de traquéia isoladas de ratos e pré-contraídas com carbacol. Especificamente, nos propusemos a:

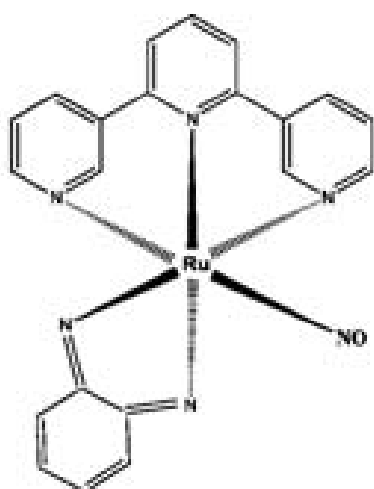
1. Estudar o efeito relaxante do Terpy em traquéias isoladas e comparar sua potência e eficácia com o NPS.
2. Verificar o envolvimento da via das ciclooxigenases no efeito de relaxamento induzido pelo Terpy.
3. Analisar o efeito do Terpy sobre a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático e pelo uniporter mitocondrial.
4. Estudar o efeito dos canais para potássio da membrana das células do músculo liso após o bloqueio farmacológico ou despolarização com KCl.
5. Avaliar a influência da via NO/GCs/GMPc e o papel das fosfodiesterases (PDEs) no relaxamento induzido pelo Terpy.
6. Analisar a influência do Terpy e NPS sobre a contração mediada pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado por carbacol ou KCl.
7. Verificar a participação do epitélio no relaxamento produzido pelo Terpy.
8. Observar a alteração no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular do músculo liso estimulado pelo Terpy.
9. Avaliação de possível efeito sinérgico entre os doadores de NO, NPS e Terpy, com terbutalina (agonista  $\beta_2$ -adrenérgico).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

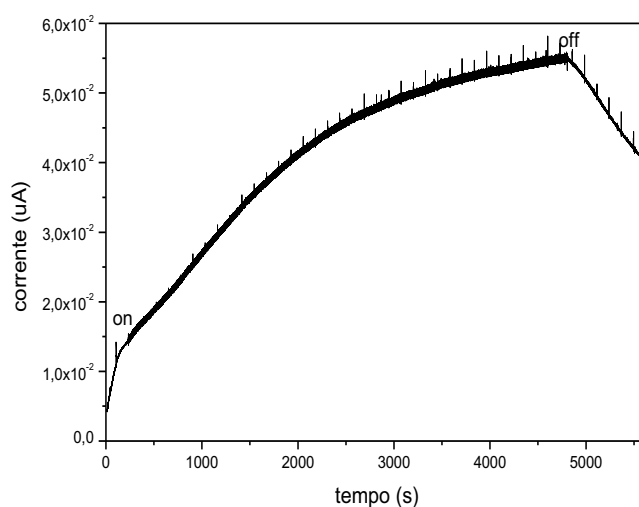
O doador de NO  $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ , apresenta a estrutura química abaixo e as suas abreviações consistem em: terpy = terpiridina e bdq = 1,2-benzoquinona-diimina (de LIMA et al., 2005, 2006).

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 nosso Laboratório para realização dos testes descritos a seguir.

O cronoamperograma abaixo 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.



$[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$



Cronoamperograma

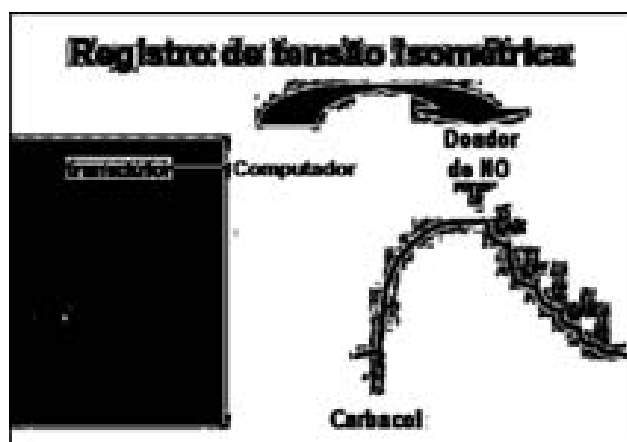
#### 3.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-250g) provenientes do Biotério Central da UFG. Estes protocolos foram submetidos à análise e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFG.

Os ratos foram sacrificados por exanguinação pela artéria aorta abdominal após anestesia superficial com éter etílico. A traquéia foi isolada e os tecidos conjuntivo e gorduroso foram removidos. As traquéias isoladas foram seccionadas em anéis de aproximadamente 3mm, montados entre dois ganchos de

metal, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixo à cuba para órgão isolado como no esquema abaixo. As respostas contráteis foram registradas num polígrafo multi-miógrafo (Narco Biosystems Inc., Houston, Texas-USA), acoplado a um programa computadorizado (WinDaq, DATAQ Instruments, OH, USA) para registro da tensão isométrica. 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;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2;  $\text{CaCl}_2$  1,6;  $\text{MgSO}_4$  1,2;  $\text{NaHCO}_3$  14,9; glicose 5,5; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ), a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Para realização dos protocolos experimentais, as preparações foram submetidas à tensão basal de 1 g determinada de acordo com a padronização do nosso laboratório com os ensaios de curva de tensão isométrica como apresentado na figura 1. Após a montagem das preparações na cuba de banho experimental, as preparações permaneceram estabilizando na tensão basal por um período mínimo de 60 min antes do início dos protocolos experimentais.



### 3.2 CURVA DE TENSÃO

Para determinação da curva de tensão, as preparações foram estimuladas a contrair com solução de KCl 90 mM em diferentes níveis de tensão basal (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g). Os anéis de traquéia ficaram por 30 min em cada uma dessas tensões e a contração gerada pelo KCl foi registrada. Após a contração, as traquéias ficaram estabilizando por mais 30 min em tensão 0 g, até que o nível de tensão subsequente fosse ajustado.

### 3.3 REATIVIDADE DO MÚSCULO LISO DA TRAQUÉIA

#### 3.3.1 Curva concentração-efeito para o agonista contrátil carbacol

Os anéis de traquéia foram submetidos à curva concentração-efeito para carbacol nas concentrações crescentes de 10 nM a 100 µM. Assim, foi possível verificar o efeito contrátil e determinar a concentração do agonista capaz de produzir 50% da resposta máxima (EC<sub>50</sub>) do Carbacol.

#### 3.3.2 Efeito relaxante do Nitroprussiato de Sódio (NPS) e Terpy em anéis de traquéia pré-contraídos com carbacol ou KCl

As curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas foram realizadas em anéis das traquéias pré-contraídos com a EC<sub>50</sub> do carbacol (0,5 µM) ou com solução de KCl 75 mM. Quando a resposta contrátil atingiu o platô, foram adicionadas concentrações crescentes do NPS (10 nM a 100 µM) ou Terpy (10 nM a 100 µM) e as respostas relaxantes foram registradas. A osmolaridade da solução nutritora foi mantida com a redução da concentração de NaCl, que passou de 130 mM para 70 mM.

#### 3.3.3 Efeito de diferentes inibidores/bloqueadores sobre o relaxamento dos anéis de traquéia desencadeado pelo NPS ou Terpy

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o NPS (10 nM a 100 µM) e para o Terpy (10 nM a 100 µM) sobre a pré-contração induzida com carbacol (EC<sub>50</sub>) em traquéia na ausência ou presença (20 min) dos seguintes inibidores: a) Indometacina, inibidor não seletivo da enzima cicloxigenase (COX), (10 µM); b) (1*H*)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-*a*)quinoxalin-1-one (ODQ), inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, (1 µM); c) 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), inibidor não seletivo das fosfodiesterases (PDE), (10 µM) d) Tetraetilamônio (TEA), bloqueador não seletivo de canais para K<sup>+</sup>, (5 mM); e) ODQ (1 µM) e TEA (5 mM) associados.

#### 3.3.4 Participação dos diferentes tipos de canais de potássio

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o NPS (10 nM a 100 µM) e para o Terpy (10 nM a 100 µM) sobre a pré-contração induzida com carbacol (EC<sub>50</sub>) em traquéias na ausência ou presença (20 min) dos seguintes bloqueadores

seletivos de canais de potássio: a) Cloreto de Bário ( $\text{BaCl}_2$ , 30  $\mu\text{M}$ ) inibidor dos canais tipo retificador ( $\text{K}_{\text{IR}}$ ); b) Glibenclamida (3  $\mu\text{M}$ ), inibidor dos canais dependentes de ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ); c) 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), inibidor dos canais dependentes de voltagem ( $\text{K}_{\text{v}}$ ); d) Apamina, (APA, 0,5  $\mu\text{M}$ ) inibidor dos canais ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  de baixa condutância ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ); e) Iberiotoxina (IBTX, 0,1  $\mu\text{M}$ ) inibidor dos canais ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta condutância ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ).

### 3.3.5 Participação do influxo de $\text{Ca}^{2+}$ em presença de carbacol ou KCl 75 mM

Para avaliar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado pelo carbacol, após estabilização, as preparações foram estimuladas com carbacol ( $\text{EC}_{50}$ ) até que as amplitudes das contrações se reproduzissem. As preparações foram novamente estimuladas com a  $\text{EC}_{50}$  do carbacol. Entretanto, em solução de Krebs zero- $\text{Ca}^{2+}$  até o desaparecimento da resposta, ou seja, a depleção dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis ao carbacol. A seguir, as traquéias foram mantidas em solução de Krebs zero- $\text{Ca}^{2+}$  e após adição de carbacol ( $\text{EC}_{50}$ ) foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para  $\text{Ca}^{2+}$  (0 a 1,6 mM) na ausência ou presença (20 min de incubação) de NPS ou Terpy, ambos na concentração que produziu o relaxamento máximo (100  $\mu\text{M}$ ).

Para avaliar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado por KCl (75 mM), após estabilização, as preparações foram lavadas em solução de Krebs zero- $\text{Ca}^{2+}$ . 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  $\text{Ca}^{2+}$  (0 a 1,6 mM) na ausência e na presença (20 min) de NPS ou Terpy 100  $\mu\text{M}$ . A osmolaridade da solução nutritora foi mantida com a redução da concentração de NaCl, que passou de 130 mM para 70 mM.

### 3.3.6 Efeito da captação de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular pelo retículo sarcoplasmático e pela mitocôndria.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o NPS (10 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) e para o Terpy (10 nM a 100  $\mu\text{M}$ ) sobre a pré-contracção induzida com carbacol ( $\text{EC}_{50}$ ) em traquéia na ausência ou na presença (20 min) do inibidor da bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, tapsigargina (1  $\mu\text{M}$ ), e do inibidor da captação uniporter mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , Ruthenium Red (10  $\mu\text{M}$ ).

### 3.3.7 Participação do epitélio

As curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas para NPS (10 nM a 100  $\mu$ M) e Terpy (10 nM a 100  $\mu$ M) foram realizadas em anéis das traquéias pré-contraídos com carbacol ( $EC_{50}$ ) intactos ou sem o epitélio. A retirada do epitélio se deu por ação mecânica, friccionando o lúmen do anel de traquéia contra uma haste de metal.

As curvas foram iniciadas quando a resposta contrátil ao carbacol atingiu o platô e as concentrações crescentes dos compostos acima foram adicionados e as respostas relaxantes registradas.

Os tecidos utilizados nos experimentos foram preservados em formaldeído tamponado 10%, incluídos em parafina e corados com Hematoxilina e Eosina para confecção de lâminas histológicas e confirmação da ausência ou presença de epitélio através de microscópio ótico Axio Scope.A1 com AxioCam MRc, Carl Zeiss no aumento original de 40X. Foram consideradas sem epitélio as preparações onde o epitélio não foi visualizado.

### 3.3.8 Avaliação de um possível efeito sinérgico com terbutalina

Este protocolo foi desenvolvido como descrito anteriormente por Vaali et al. (2000), com algumas modificações.

As curvas de relaxamento concentração-efeito cumulativas para Terbutalina (100 nM a 1 mM) foram realizadas em anéis de traquéias pré-contraídas com carbacol ( $EC_{50}$ ). As curvas para terbutalina foram realizadas na ausência (controle) e na presença de NPS ou Terpy em duas concentrações diferentes (0,1  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M). A adição desses doadores de NO se deu quando a pré-contracção com carbacol atingiu o platô e após cerca de 5 minutos, à curva para terbutalina foi iniciada.

As concentrações 0,1  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M de NPS ou Terpy foram escolhidas por apresentarem ausência de efeito relaxante.

## 3.4 MEDIDAS DA CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE $Ca^{2+}$ EM ANÉIS DE TRAQUÉIAS DE RATO POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Com objetivo de quantificar a redução de cálcio citosólico por esses compostos, a traquéia foi cortada em anéis de aproximadamente 100  $\mu$ m de espessura com o auxílio de um bisturi e mantida em placa de Petri contendo solução

de Hanks incompleta (sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{+}$ , a fim de preservar as células vivas por maior tempo) com a seguinte composição (em mM): 145,0 NaCl, 5,0 KCl, 0,5  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10,0 dextrose e 10,0 HEPES (pH 7,4).

Os anéis de traquéia foram colocados em lamínulas (42 mm de diâmetro para microscopia confocal) pré-tratadas com poli-L-lisina (1/2 v/v) e acondicionada em placa de Petri para incubação em estufa de  $\text{CO}_2$  a 5% por aproximadamente 20 minutos.

Os anéis foram carregados com 10  $\mu\text{M}$  da sonda fluorescente sensível ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  (FLUO-3AM) durante 40 minutos em temperatura ambiente. O FLUO-3AM foi preparado em solução de Hanks completa. O excesso de corante foi removido pela troca da solução de Hanks completa e após acoplamento do material ao microscópio, 100  $\mu\text{M}$  do Terpy ou NPS foram adicionados à placa. A sonda fluorescente (FLUO-3) foi excitada com laser de argônio em 488 nm sendo a intensidade de emissão de fluorescência medida em 510 nm. A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foi obtida pela mudança na intensidade de fluorescência (IF), que é diretamente proporcional à  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Foi calculada a diferença ( $\Delta$ ) entre IF inicial ( $F_0$ ) e IF final ( $F$ ), sendo esta diferença convertida em %.  $F_0$  foi considerado como basal que corresponde a 100% da IF. Sendo assim, a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foi expressa como porcentagem da diferença na intensidade de fluorescência ( $\% \Delta \text{IF}$ ), a qual indica queda na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que foi calculada pela fórmula  $\% \Delta \text{IF} = (F - F_0 / F_0) \times 100$ . A medida da concentração citosólica dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  foi realizada antes e após a adição do Terpy ou NPS (100  $\mu\text{M}$ ) à placa de petri.

As imagens foram feitas em microscópio confocal Leica TCS SP5 com objetiva de imersão em água e aumento de 63X. Utilizou-se software de análise temporal (time course) Leica Mycosystem LAS AF Lite para capturar as imagens em intervalos de 2 segundos ao longo do tempo.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de tensão isométrica foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de pelo menos três experimentos ( $n=3-11$ ), obtidos de diferentes animais. Os gráficos foram realizados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) na versão 3.02 de 2001.

As determinações da  $\text{EC}_{50}$  (concentração que produz 50% da resposta máxima) e efeito máximo ( $E_{\text{max}}$ ) foram realizadas utilizando o método de regressão

não linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) na versão 3.02 de 2001.

A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido do pós-teste de Newman-Keuls pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation) na versão 3.02 de 2001. Foi adotado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para que as diferenças sejam consideradas estatisticamente significativas.

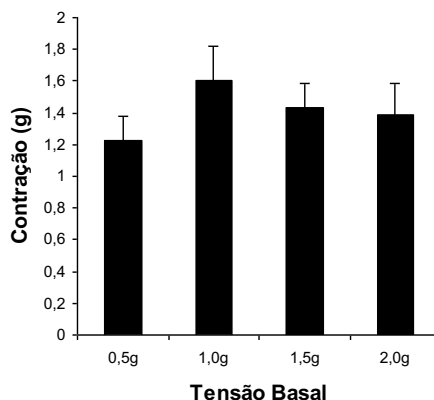
## 4 RESULTADOS

### 4.1 CURVA DE TENSÃO

A figura 1 representa os valores de tensão em grama (g) provocados pela presença de KCl 90 mM (n=3).

Para determinação da curva de tensão isométrica, as preparações foram estimuladas a contrair com solução de KCl 90 mM em diferentes níveis de tensão basal (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g). Os anéis de traquéia ficaram por 30 minutos em cada uma dessas tensões e a contração gerada pelo KCl foi registrada.

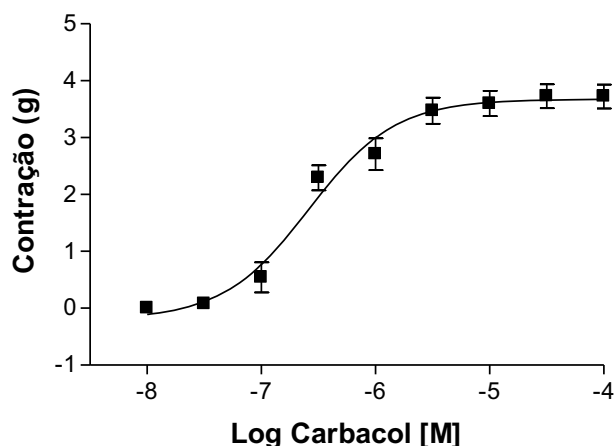
Como resultado, a tensão basal de 1 g foi a que produziu maior nível de força isométrica (figura 1) e por isto foi a tensão basal usada nos nossos protocolos experimentais.



**Figura 1: Curva de tensão em traquéias isoladas de ratos.** As barras verticais representam as respostas contráteis expressas em grama (g) de tensão em anéis de traquéia gerados por KCl 90 mM. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM.

### 4.2 CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO PARA O AGONISTA CONTRÁTIL CARBACOL

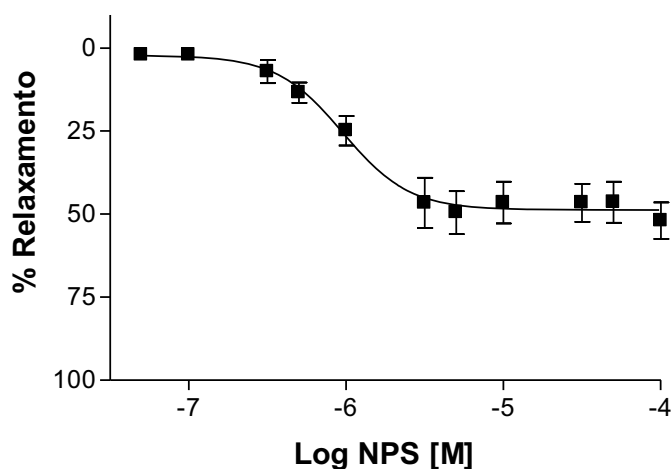
O carbacol induziu contração de forma concentração-dependente nos anéis de traquéia. O valor de contração máxima ( $E_{max}$ ) observado com os experimentos foi de  $3,72 \pm 0,18$  g e de  $pD_2$  ( $-\log$  da  $EC_{50}$ ) de  $6,57 \pm 0,10$ ,  $n=8$ . Diante desses resultados, a concentração efetiva capaz de causar 50% da contração de traquéia ( $EC_{50}$ ) foi estabelecida e padronizada como  $0,5 \mu M$  de acordo com a figura 2.



**Figura 2: Efeito contrátil do carbacol em traquéias isoladas de ratos.** Curva concentração-efeito cumulativa para carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM das respostas contráteis expressas em g de tensão.

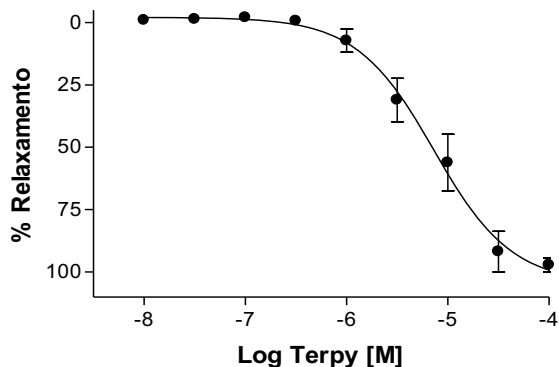
#### 4.3 EFEITO RELAXANTE DO NPS E DO TERPY EM ANÉIS DE TRAQUÉIAS PRÉ-CONTRAÍDAS COM CARBACOL

De acordo com a figura 3, o NPS induziu relaxamento de forma concentração-dependente. Os valores de  $E_{max}$  e de  $pD_2$  são respectivamente:  $55,1 \pm 5,5\%$  e  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$ .



**Figura 3: Efeito relaxante do NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curva concentração-efeito cumulativas para NPS em preparações pré-contraídas com carbacol ( $EC_{50}$ ). Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

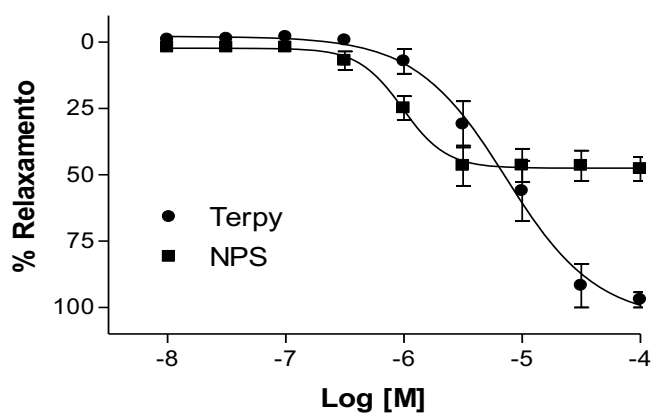
Como demonstrado na figura 4, o composto macrocíclico  $[Ru(terpy)(bdq)NO^+]^{3+}$  (Terpy) induziu relaxamento de forma concentração-dependente com  $E_{max}$  de  $97,2 \pm 2,8\%$ . O valor de  $pD_2$  encontrado foi  $5,16 \pm 0,14$  ( $n=7$ ).



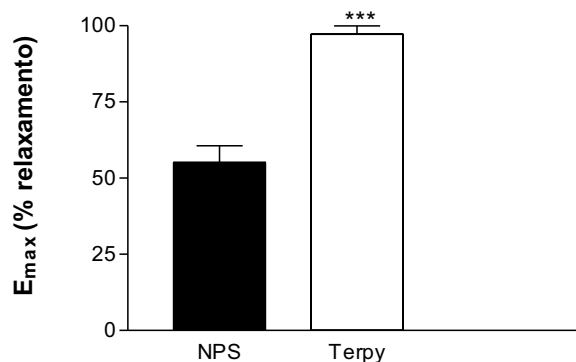
**Figura 4: Efeito relaxante do Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curva concentração-efeito cumulativas para Terpy em preparações pré-contraídas com carbacol ( $EC_{50}$ ). Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem. (n=7)

As figuras 5 e 6 mostram uma comparação entre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy.

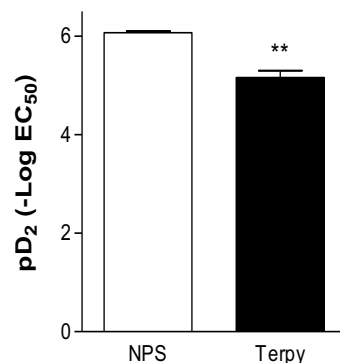
O nível de relaxamento ( $E_{max}$ ) induzido pelo Terpy foi significativamente superior ( $P < 0,001$ ), cerca de 43% maior ao apresentado pelo NPS (figura 5 e 6). Já para a potência, os valores de  $pD_2$  apresentados pelo NPS foi 1,17 vezes maior que o apresentado pelo Terpy, uma diferença significativa com  $P < 0,01$  (figura 7).



**Figura 5: Comparação entre o efeito relaxante do NPS e do Terpy em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com carbacol.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS e Terpy. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



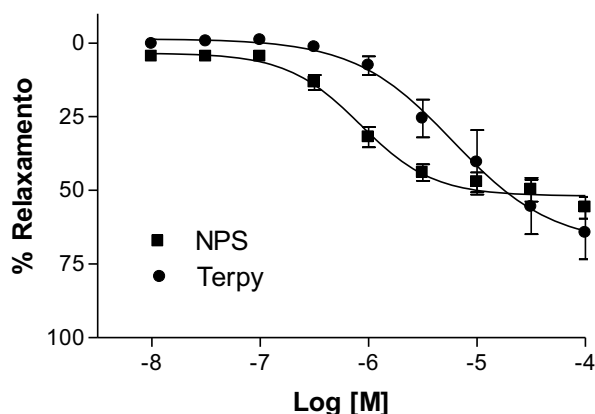
**Figura 6: Comparação entre o efeito relaxante máximo do Terpy e do NPS.** Barras verticais representam os valores obtidos no  $E_{max}$  do relaxamento provocado pelo Terpy e pelo NPS em preparações isoladas e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\*  $P < 0,001$ .



**Figura 7: Comparação entre a potência do Terpy e a do NPS.** 1 $\mu$ M. Barras verticais representam os valores obtidos pelo pD<sub>2</sub> provocado pelo Terpy e pelo NPS em preparações isoladas e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\* P < 0,01.

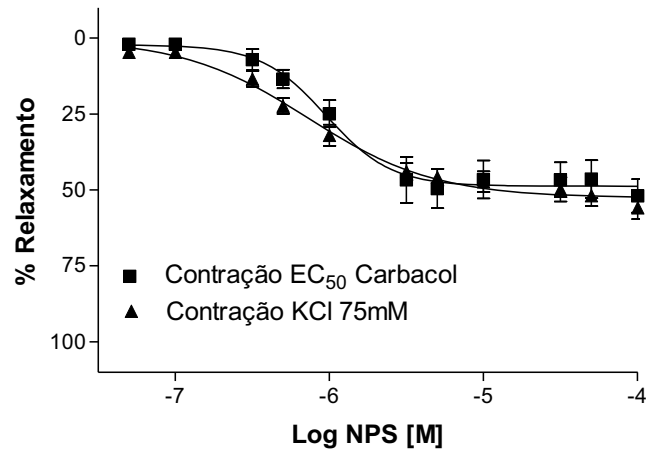
#### 4.4 EFEITO RELAXANTE DO NPS E DO TERPY EM ANÉIS DE TRAQUÉIAS PRÉ-CONTRAÍDAS COM KCl

A figura 8 mostra uma comparação entre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em preparações pré-contraídas com 75 mM de KCl. Os valores de E<sub>max</sub> para NPS são 61,2  $\pm$  6,0% e para o Terpy 49,5  $\pm$  7,0%. Os valores de pD<sub>2</sub> foram 6,24  $\pm$  0,08, n=5 e 4,94  $\pm$  0,16, n=4, respectivamente. Essas diferenças não foram estatisticamente significativas.



**Figura 8: Comparação entre o efeito relaxante do NPS e do Terpy em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com KCl 75 mM.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS e Terpy. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

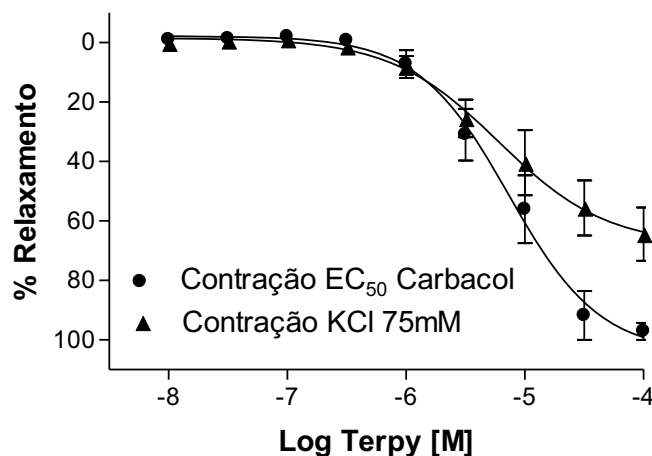
A figura 9 apresenta uma comparação entre o relaxamento induzido pelo NPS em anéis de traquéias contraídas com solução de KCl (75 mM) ou com carbacol. Os valores de E<sub>max</sub> em presença de KCl foram 61,2  $\pm$  6,0% e em presença de carbacol foram 55,1  $\pm$  5,5%. Os valores de pD<sub>2</sub> foram 6,24  $\pm$  0,08, n=5 e 6,07  $\pm$  0,03, n=5, respectivamente. Essas diferenças não foram estatisticamente significativas.



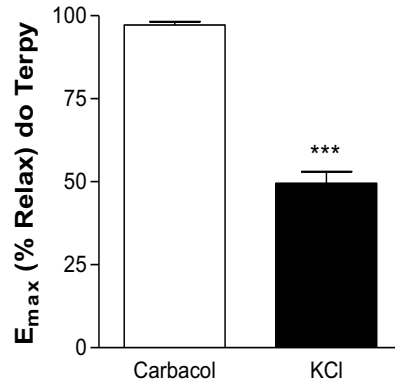
**Figura 9:** Curvas de comparação entre o efeito relaxante do NPS em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com KCl (75 mM) ou com carbacol. Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem

As figuras 10 e 11 apresentam uma comparação entre o relaxamento induzido pelo Terpy em anéis de traquéias contraídas com solução de KCl (75 mM) ou com carbacol. Os valores de  $E_{max}$  em presença de carbacol foram  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  e em presença de KCl foram  $49,5 \pm 7,0\%$ ,  $n=4$ , uma redução significativa de 49%, ( $P<0,001$ ).

Os valores de  $pD_2$  em preparações pré-contraídas com KCl foram  $4,94 \pm 0,16$ ,  $n=5$  e quando pré-contraídas com carbacol foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$ . Essas comparações não foram estatisticamente significativas.



**Figura 10:** Curvas de comparação entre o efeito relaxante do Terpy em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com carbacol ou KCl 75 mM. Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem



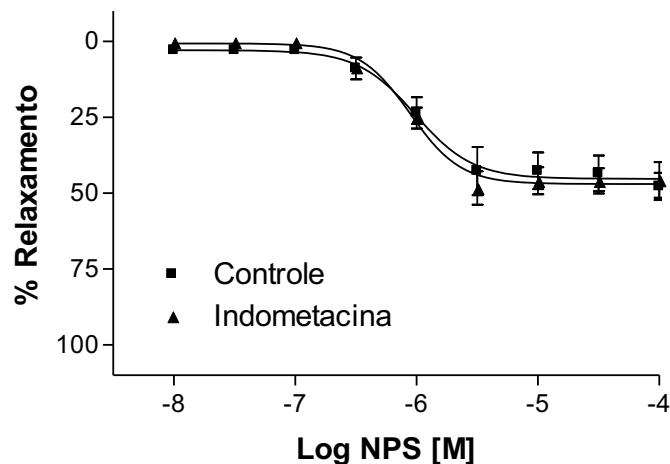
**Figura 11: Comparação entre o feito relaxante máximo do Terpy em traquéias isoladas de ratos pré-contraídas com carbacol ou com KCl 75 mM.** Barras verticais representam os valores obtidos no  $E_{max}$  do relaxamento provocado pelo Terpy. Diferença estatística: \*\*\*  $P < 0,001$ .

#### 4.5 EFEITO DE DIFERENTES INIBIDORES/BLOQUEADORES SOBRE O RELAXAMENTO DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL DESENCADEADO PELO NPS E PELO TERPY

##### 4.5.1 Efeito do inibidor da ciclooxigenase (indometacina) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

Os percentuais de relaxamento produzido pelo NPS ou Terpy na ausência e na presença (20 min) do inibidor da ciclooxigenase (COX) indometacina 10  $\mu\text{M}$  estão apresentados na figura 12 e 13, respectivamente.

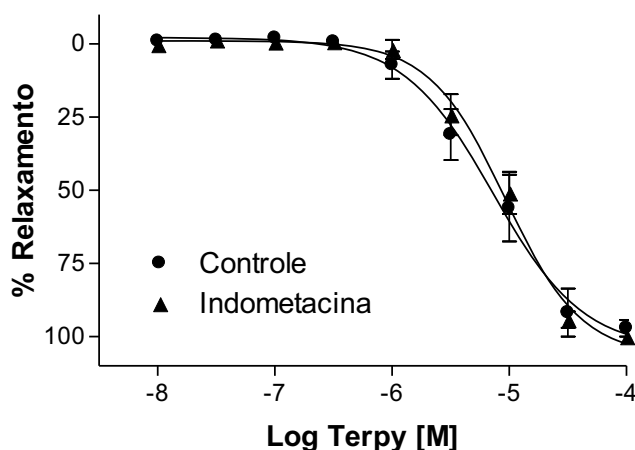
O inibidor da COX não provocou variação significativa nem para a resposta máxima nem para o  $pD_2$  do NPS. Os valores de  $E_{max}$  na ausência de indometacina foram  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$ , e na presença deste  $45,7 \pm 5,8\%$ ,  $n=6$ . Na ausência de indometacina os valores de  $pD_2$  encontrados foram  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  e na presença  $5,91 \pm 0,16$ ,  $n=6$ .



**Figura 12: Efeito da indometacina sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS antes e depois (20 min) da incubação com indometacina (10  $\mu\text{M}$ ) e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

Também não houve variação significativa nem para a resposta máxima nem para o  $pD_2$  do Terpy em presença de indometacina. Os valores de  $E_{max}$  do Terpy passaram de  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  para  $100,5 \pm 1,0\%$ ,  $n=6$ . Os valores de  $pD_2$  na ausência do inibidor foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  e na presença  $5,06 \pm 0,07$ ,  $n=6$ .

Portanto, a sobreposição das curvas apresentadas nas figuras 12 e 13 sugerem que os derivados do ácido araquidônico metabolizados pela COX não interferem no mecanismo celular de relaxamento do músculo liso de traquéia gerado pelo Terpy ou NPS.

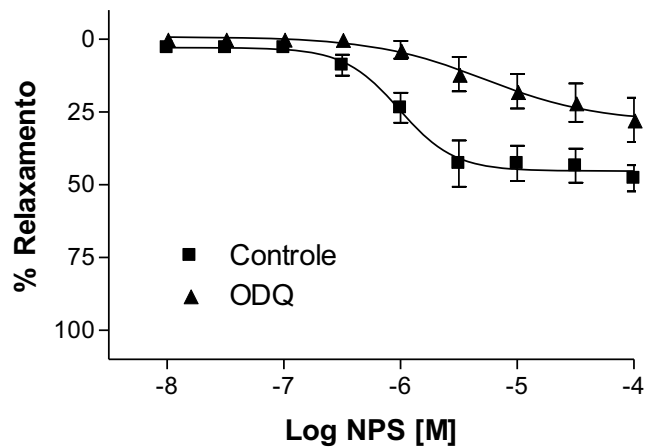


**Figura 13: Efeito da indometacina sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy antes e depois (20 min) da incubação com indometacina ( $10 \mu\text{M}$ ) e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

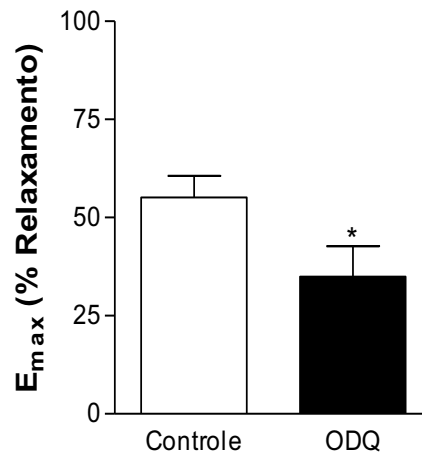
#### 4.5.2 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (ODQ) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

Os percentuais de relaxamento produzido pelo NPS ou Terpy na ausência e na presença (incubado por 20 min) do ODQ ( $1 \mu\text{M}$ ) estão apresentados nas figuras 14 e 17.

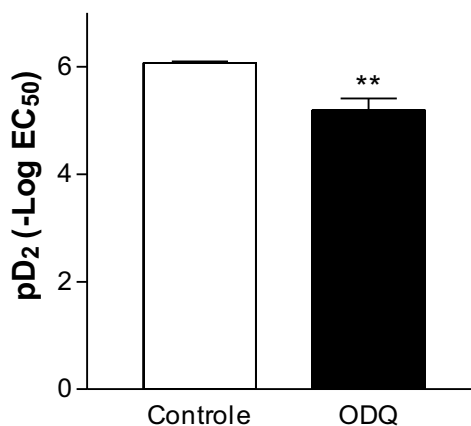
Na presença desse inibidor, o NPS apresentou sua resposta máxima diminuída de  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$  para  $35,0 \pm 7,7\%$ ,  $n=7$ , uma redução de cerca de 36%. Esses dados apresentam diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) e estão apresentados nas figuras 14 e 15. Os valores de  $pD_2$  reduziram 14,5%, quando passaram de  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  para  $5,19 \pm 0,21$ ,  $n=7$  na presença de ODQ, evidenciando um deslocamento da curva para a direita. Esses resultados são significativos ( $P < 0,01$ ) e estão apresentados na figura 16.



**Figura 14: Efeito do ODQ sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS antes e depois da incubação por 20 min com ODQ (1  $\mu$ M) em preparações pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



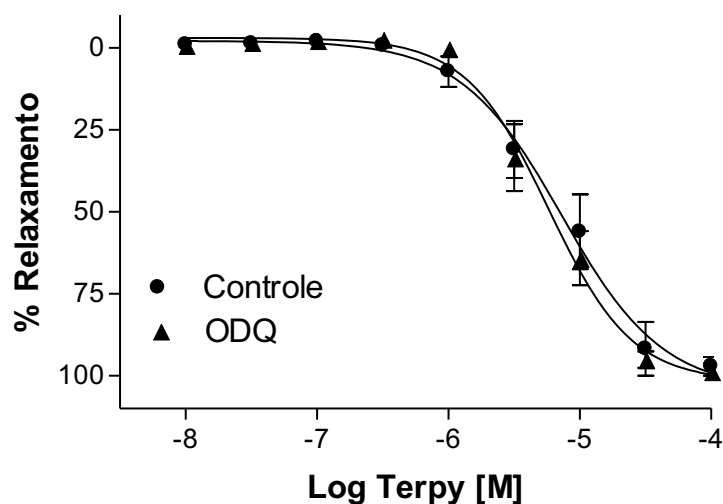
**Figura 15: Efeito máximo do NPS na presença de ODQ.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no E<sub>max</sub> do relaxamento provocado pelo NPS na presença e na ausência de ODQ (1  $\mu$ M, 20 min) e pré-contraídas com carbacol em traquéias de ratos. Diferença estatística: \*P < 0,05.



**Figura 16: Potência do NPS na presença de ODQ.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM do pD<sub>2</sub> do NPS na presença e na ausência de ODQ (1  $\mu$ M, 20 min) e pré-contraídas com carbacol em traquéias de ratos. Diferença estatística: \*\* P < 0,01.

O percentual de relaxamento produzido pelo Terpy na ausência e na presença (20 min) de ODQ (1  $\mu$ M) estão apresentados na figura 17.

O inibidor não apresentou variação significativa na resposta máxima do Terpy. Os valores de  $E_{max}$  na ausência de ODQ foram  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$ , e na presença deste  $98,7 \pm 1,3\%$ ,  $n= 5$ . Os valores de  $pD_2$  também não apresentaram diferença significativa. Na ausência de ODQ os valores de  $pD_2$  encontrados foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  e na presença  $5,22 \pm 0,11$ ,  $n= 5$ , não havendo, portanto, alteração na potência do Terpy.



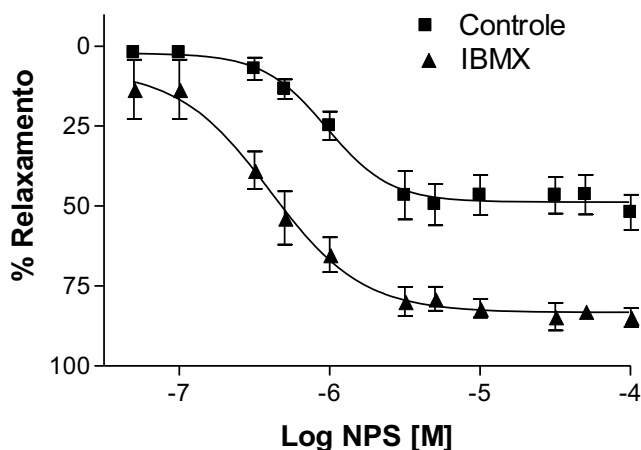
**Figura 17: Efeito do ODQ sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy antes e depois da incubação por 20 min com ODQ (1  $\mu$ M) em preparações pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

#### 4.5.3 Efeito do inibidor das fosfodiesterases (IBMX) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

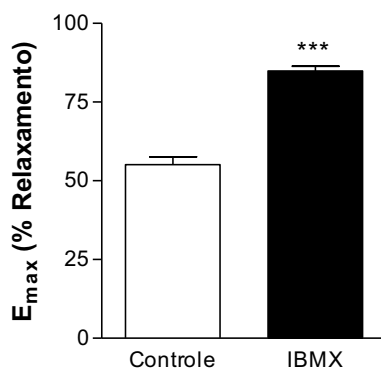
Os percentuais de relaxamento produzido pelo NPS na ausência e na presença (20 min) de IBMX (10  $\mu$ M) estão apresentados nas figuras 18 e 19.

O IBMX provocou aumento significativo ( $P<0,001$ ) na resposta máxima do NPS de cerca de 53% (figura 19). Os valores de  $E_{max}$  na ausência de IBMX foram  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$  e na presença deste  $84,6 \pm 3,0\%$ ,  $n=4$ .

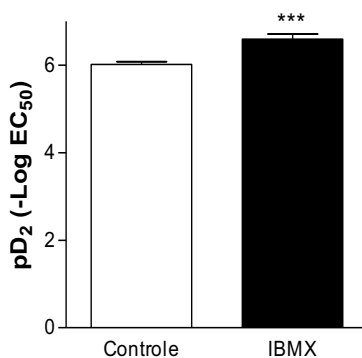
Os valores de  $pD_2$  também apresentaram aumento significativo de 9,8% ( $P<0,001$ ) como apresentado na figura 20. Na ausência de IBMX os valores encontrados foram  $6,01 \pm 0,06$ ,  $n=6$  e na presença  $6,6 \pm 0,11$ ,  $n=4$ .



**Figura 18: Efeito do IBMX sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de IBMX (10  $\mu$ M) e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



**Figura 19: Efeito máximo do NPS na presença de IBMX.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no E<sub>max</sub> do relaxamento em traquéias de ratos provocado pelo NPS na presença (20 min) ou ausência de IBMX (10  $\mu$ M) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\* P < 0,001.

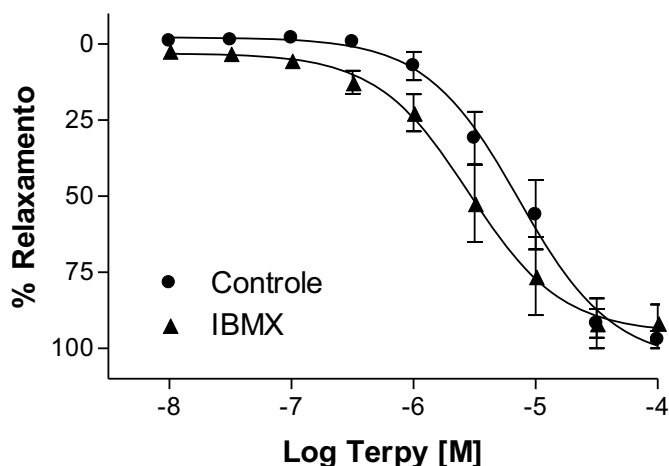


**Figura 20: Potência do NPS na presença de IBMX.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores do pD<sub>2</sub> do NPS em traquéias de ratos após incubação (20 min) com IBMX (10  $\mu$ M) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\* P < 0,001.

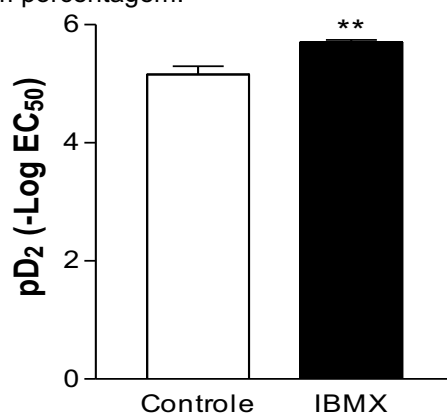
A figura 21 apresenta o percentual de relaxamento produzido pelo Terpy na ausência e na presença (20 min) de IBMX (10  $\mu$ M) em preparações pré-contraídas com carbacol.

O inibidor da fosfodiesterase não apresentou variação significativa para a resposta máxima do Terpy. Na ausência de IBMX os valores de  $E_{max}$  foram  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  e na presença  $96,0 \pm 1,6\%$ ,  $n=4$ .

Para o  $pD_2$ , na ausência do inibidor os valores foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  e na presença  $5,70 \pm 0,035$ ,  $n=4$ , deslocando a curva para a esquerda, mostrando haver aumento significativo ( $P<0,01$ ), como apresentado na figura 22.



**Figura 21: Efeito do IBMX sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy na presença (20 min) ou ausência de IBMX ( $10 \mu\text{M}$ ) em traquéias e pré-contraídas com carbachol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



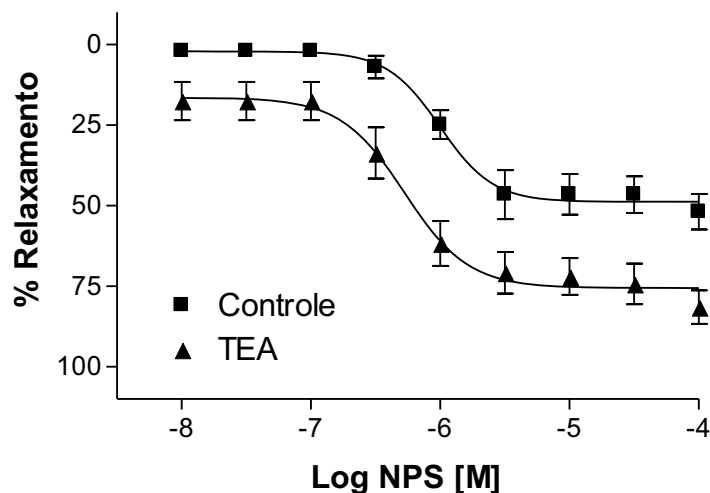
**Figura 22: Potência do Terpy na presença de IBMX.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores de  $pD_2$  do Terpy na presença (20 min) ou ausência de IBMX ( $10 \mu\text{M}$ ) em traquéias de ratos e pré-contraídos com carbachol. Diferença estatística: \*\*  $P < 0,01$ .

#### 4.5.4 Efeito do bloqueador não-seletivo de canais de potássio (TEA) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

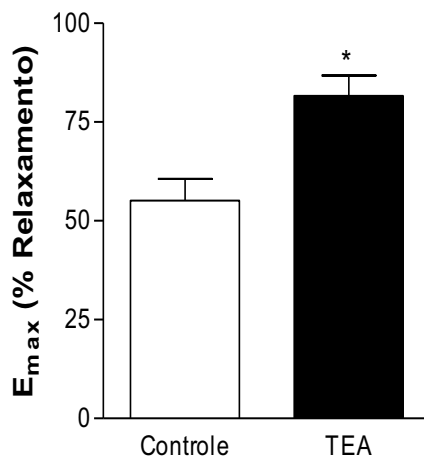
O percentual de relaxamento produzido pelo NPS na ausência e na presença (20 min) do TEA (5 mM) estão apresentados nas figuras 23 e 24.

O TEA provocou aumento significativo ( $P<0,05$ ) na resposta máxima do NPS de cerca de 49% (figura 23). Os valores de  $E_{max}$  na ausência de TEA foram

55,1 ± 5,5 %, n=5 e na presença deste 82,4 ± 5,8%, n=8. Os valores de pD<sub>2</sub> não apresentaram diferença significativa. Os valores para NPS passaram de 6,07 ± 0,03, n=5 para 6,86 ± 0,39, n=8.



**Figura 23: Efeito do TEA sobre o relaxamento do NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de TEA (5 mM) em preparações pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias ± EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

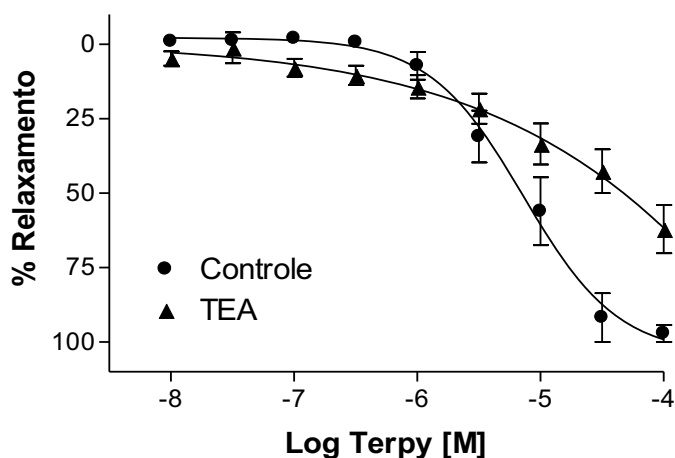


**Figura 24: Efeito máximo do NPS na presença de TEA.** Barras verticais representam a média ± EPM dos valores obtidos no E<sub>max</sub> do relaxamento provocado pelo NPS em traquéias de ratos na presença (20 min) ou ausência de TEA (5 mM) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \* P < 0,05.

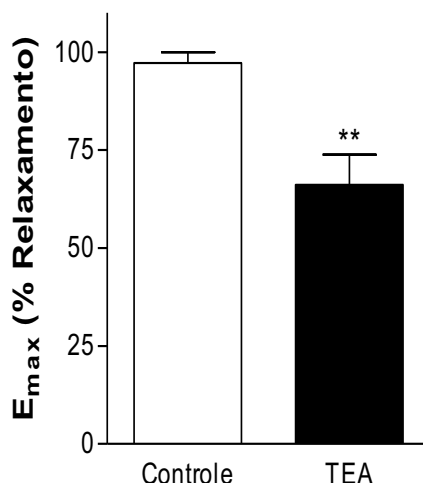
Os percentuais de relaxamento produzido pelo Terpy na ausência e na presença (20 min) do TEA estão apresentados nas figuras 25 e 26.

O TEA provocou diminuição significativa (P < 0,01) na resposta máxima do Terpy de cerca de 32% (figura 26). Os valores de E<sub>max</sub> na ausência de TEA foram 97,2 ± 2,8%, n=7 e na presença deste 66,1 ± 7,7%, n=11.

Os valores de  $pD_2$  não apresentam diferença significativa. Na ausência do TEA, os valores encontrados foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  e na presença  $4,30 \pm 0,40$ ,  $n=11$ .



**Figura 25: Efeito do TEA sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy na presença (20 min) ou ausência de TEA (5 mM) em preparações pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



**Figura 26: Efeito máximo do Terpy na presença de TEA.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no  $E_{max}$  do relaxamento provocado pelo Terpy na presença (20 min) ou ausência de TEA (5 mM) em traquéias de ratos e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*  $P < 0,01$ .

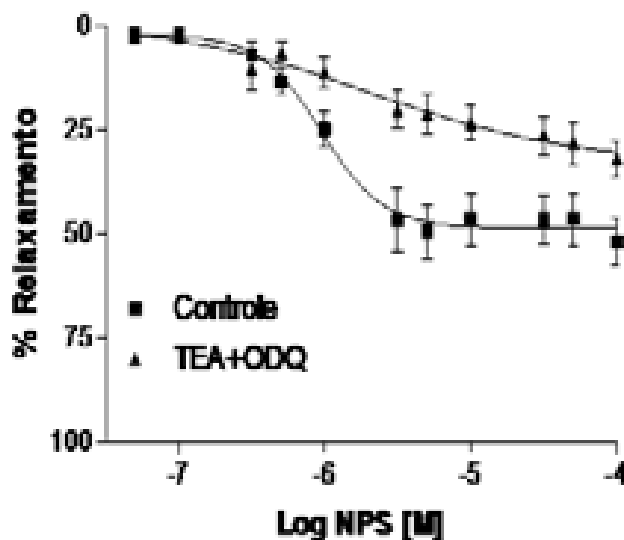
#### 4.5.5 Efeito do inibidor seletivo da guanilato ciclase (ODQ) associado ao bloqueador não-seletivo de canais de potássio (TEA) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia.

Os percentuais de relaxamento produzido pelo NPS na ausência e na presença (20 min) de TEA (5 mM) e de ODQ (1  $\mu$ M) estão apresentados nas figuras 27 e 28.

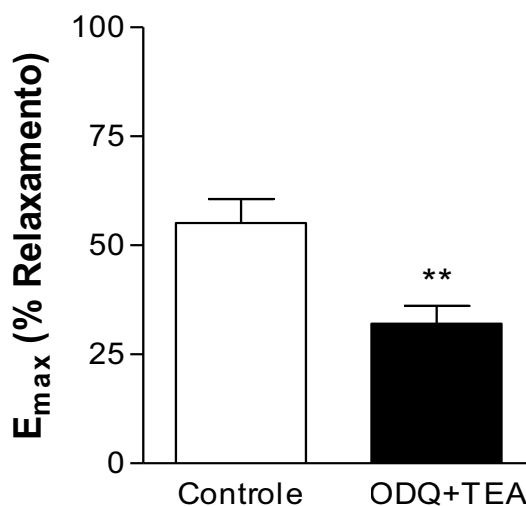
A associação do TEA com ODQ provocou diminuição significativa ( $P < 0,01$ ) na resposta máxima do NPS (figura 28) de cerca de 42%. O valor de  $E_{max}$

na ausência dos inibidores foi  $55,1 \pm 5,5$  %,  $n=5$  e na presença destes  $32,1 \pm 4,1$ %,  $n=8$ .

Os valores de  $pD_2$  não apresentaram diferença significativa. Na ausência de TEA e ODQ, os valores encontrados foram  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  e na presença  $5,62 \pm 0,19$ ,  $n=8$ .



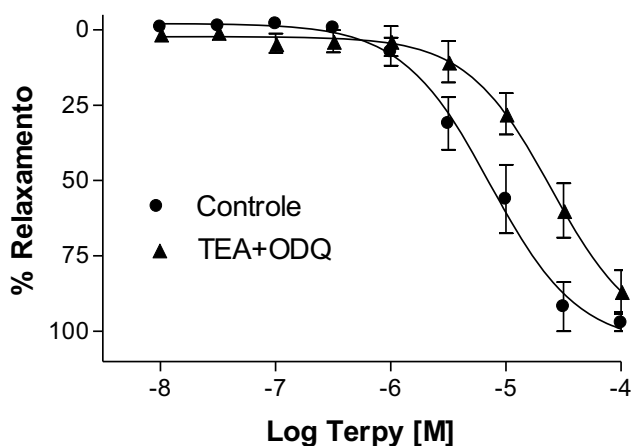
**Figura 27:** Efeito da associação de TEA+ODQ sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de ODQ ( $1 \mu\text{M}$ ) e TEA ( $5 \text{mM}$ ) em traquéias de ratos e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



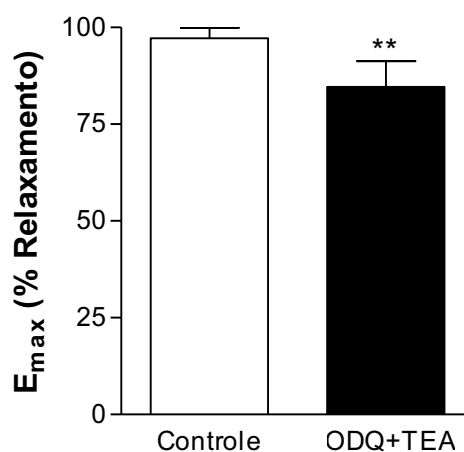
**Figura 28:** Efeito máximo do NPS em presença de TEA+ODQ. Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no  $E_{\text{max}}$  do relaxamento provocado pelo NPS em traquéias de ratos incubadas na presença (20 min) ou ausência de ODQ ( $1 \mu\text{M}$ ) e TEA ( $5 \text{mM}$ ) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*  $P < 0,01$ .

Os percentuais de relaxamento produzido pelo Terpy na ausência e na presença de TEA e de ODQ estão apresentados na figura 29 e 30.

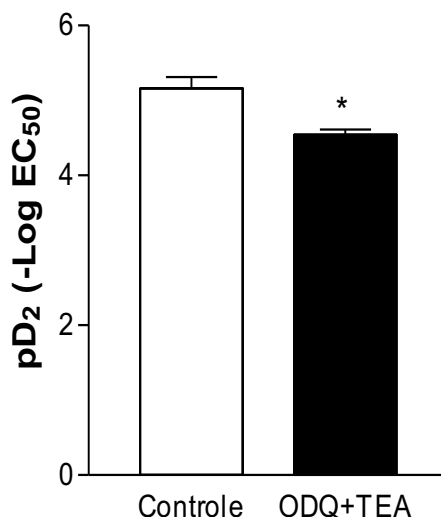
A associação do TEA (5 mM) com ODQ (1  $\mu$ M) modificou significativamente a resposta máxima do Terpy ( $P < 0,01$ , figura 30). O valor de  $E_{max}$  na ausência do bloqueador/inibidor foi  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  e na presença destes  $84,6 \pm 6,61\%$ ,  $n=5$ . Já os valores de  $pD_2$  apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com a figura 31. Na ausência de TEA e ODQ os valores encontrados foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  e na presença  $4,54 \pm 0,07$ ,  $n=5$ , gerando um deslocamento da curva para a direita.



**Figura 29: Efeito da associação de TEA+ODQ sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy na presença (20 min) ou ausência de TEA (5 mM) e ODQ (1  $\mu$ M) em traquéias de ratos e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



**Figura 30: Efeito máximo do Terpy na presença de TEA+ODQ.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no  $E_{max}$  do relaxamento provocado pelo Terpy na presença (20 min) ou ausência de ODQ (1  $\mu$ M) e TEA (5 mM) em traquéias de ratos e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*  $P < 0,01$ .



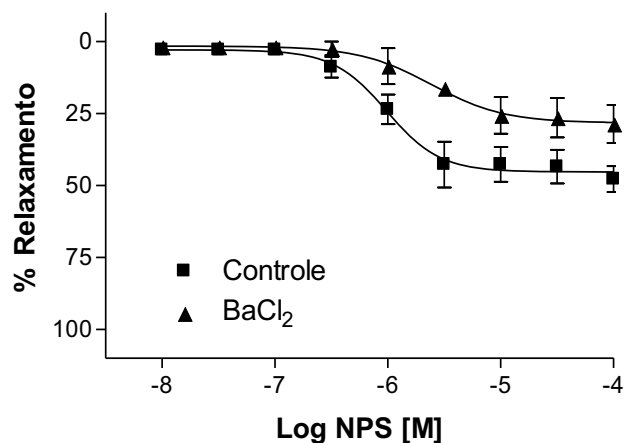
**Figura 31: Potência do Terpy na presença da associação de TEA+ODQ.** Barras verticais representam os valores de pD<sub>2</sub> do Terpy em traquéias de ratos na presença (20 min) ou ausência de ODQ (1 μM) e TEA (5 mM) e pré-contraídas com carbachol. Diferença estatística: \* P < 0,05.

#### 4.6 EFEITO DE DIFERENTES BLOQUEADORES SELETIVOS DE CANAIS DE POTÁSSIO SOBRE O RELAXAMENTO INDUZIDO PELO NPS E PELO TERPY EM TRAQUÉIAS

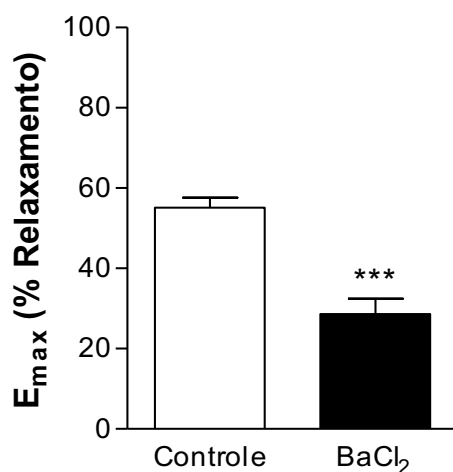
##### 4.6.1 Efeito do bloqueador dos canais de K<sup>+</sup> tipo retificador (K<sub>IR</sub>), BaCl<sub>2</sub> sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

Os percentuais de relaxamento produzido pelo NPS na ausência e na presença (20 min) de cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>) (30 μM) estão apresentados nas figuras 32 e 33.

O bloqueador dos canais de potássio do tipo retificador (K<sub>IR</sub>) apresentou diminuição significativa (P < 0,001) para o efeito máximo, uma redução de cerca de 57% (figura 33). O E<sub>max</sub> na ausência do BaCl<sub>2</sub> apresentou valores de 55,1 ± 5,5%, n=5 e na presença 23,6 ± 6,8%, n=4. Para o pD<sub>2</sub>, os valores passaram de 6,07 ± 0,03, n=5 para 6,18 ± 0,12, n=4, portanto, sem diferença significativa.



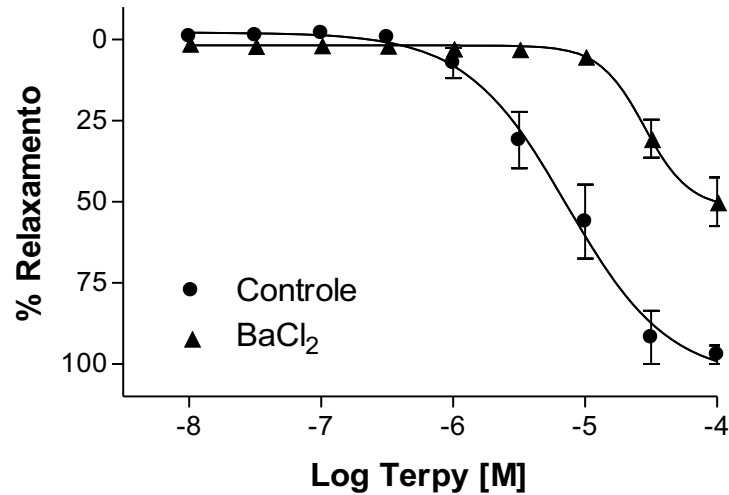
**Figura 32: Efeito do BaCl<sub>2</sub> sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de BaCl<sub>2</sub> (30 μM) em traquéia de rato e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias ± EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



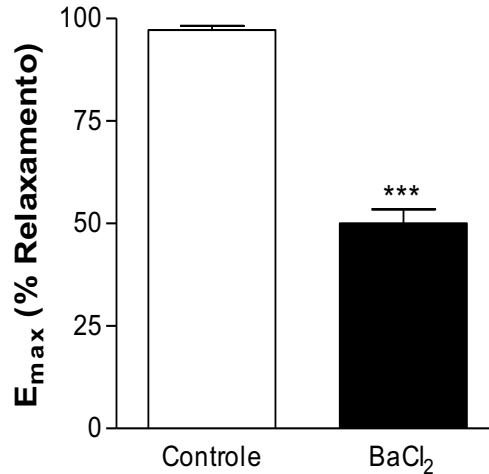
**Figura 33: Efeito máximo do NPS na presença de BaCl<sub>2</sub>.** Barras verticais representam a média ± EPM dos valores obtidos no E<sub>max</sub> do relaxamento provocado pelo NPS em traquéias de ratos na presença (20 min) ou ausência de BaCl<sub>2</sub> (30 μM) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\* P < 0,001.

As figuras 34 e 35 apresentam o percentual de relaxamento produzido pelo Terpy na ausência e na presença (20 min) de BaCl<sub>2</sub> (30 μM) em preparações pré-contraídas com carbacol.

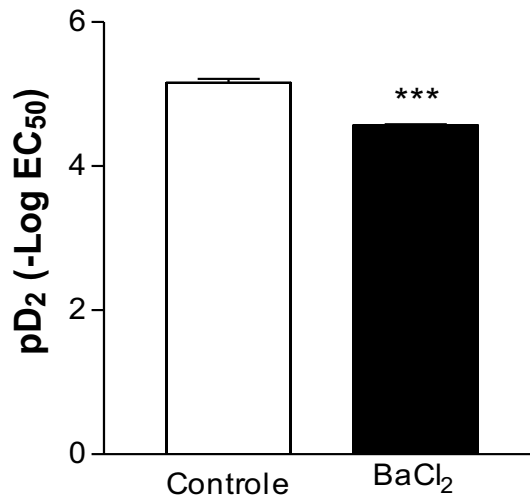
O bloqueador dos canais K<sub>IR</sub> apresentou diminuição significativa (P < 0,001) tanto para o efeito máximo, redução de 48%, (figura 35) quanto para a potência do Terpy, redução de 11%, (figura 36). O E<sub>max</sub> na ausência do BaCl<sub>2</sub> apresentou valores de 97,2 ± 2,8%, n=7 e na presença 50,1 ± 7,5%, n=5. Para o pD<sub>2</sub>, os valores passaram de 5,16 ± 0,14, n=7 para 4,57 ± 0,027, n=5.



**Figura 34: Efeito do BaCl<sub>2</sub> sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy na presença (20 min) ou ausência de BaCl<sub>2</sub> (30  $\mu$ M) em traquéia de ratos pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



**Figura 35: Efeito máximo do Terpy na presença de BaCl<sub>2</sub>.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no E<sub>max</sub> do relaxamento provocado pelo Terpy em traquéias de ratos na presença (20 min) ou ausência de BaCl<sub>2</sub> (30  $\mu$ M) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\* P < 0,001.



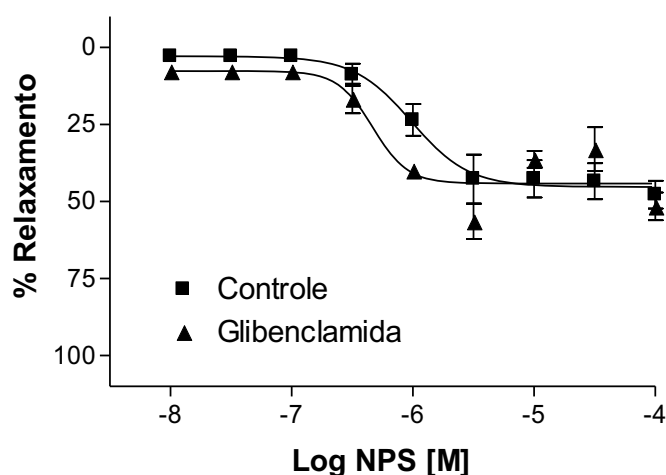
**Figura 36: Potência do Terpy na presença de BaCl<sub>2</sub>.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores do pD<sub>2</sub> do Terpy na presença (20 min) ou ausência de com BaCl<sub>2</sub> (30  $\mu$ M) em traquéias de ratos e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\* P < 0,001.

#### 4.6.2 Efeito do bloqueador dos canais de $K^+$ dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ), glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

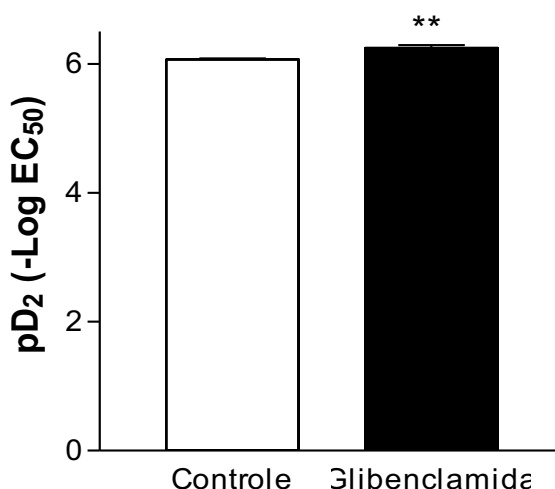
Os percentuais de relaxamento produzidos pelo NPS na ausência e na presença (20 min) de glibenclamida ( $3 \mu\text{M}$ ) estão apresentados na figura 37.

O bloqueador dos canais de potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) não apresentou diferença significativa para o efeito máximo do NPS. O  $E_{\text{max}}$  na ausência da glibenclamida apresentou valores de  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$  e na presença  $51,5 \pm 9,3\%$ ,  $n=5$ .

Para o  $pD_2$ , os valores passaram de  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  para  $6,25 \pm 0,086$ ,  $n=5$ , um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) representado na figura 38.



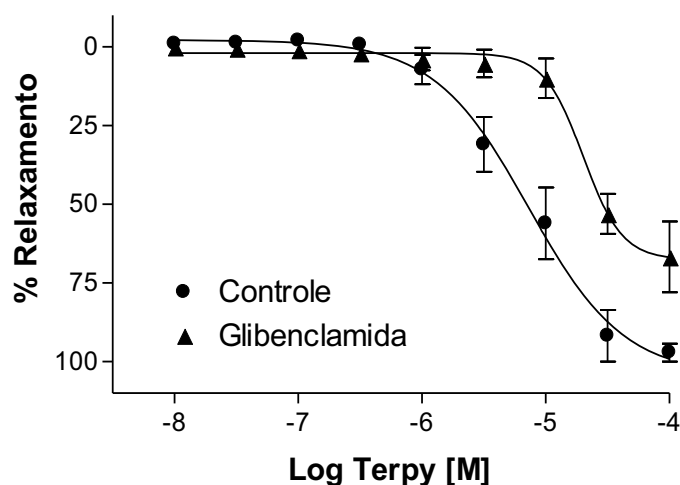
**Figura 37: Efeito da glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de glibenclamida ( $3 \mu\text{M}$ ) em traquéia de ratos pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



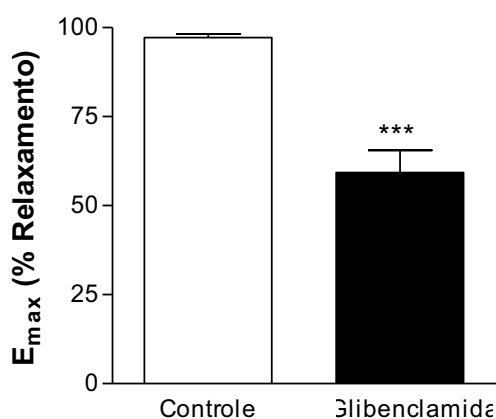
**Figura 38: Potência do NPS na presença de glibenclamida.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores do  $pD_2$  do NPS em traquéias de ratos antes na presença (20 min) ou ausência de glibenclamida ( $3 \mu\text{M}$ ) e pré-contraídas com carbacol em traquéias de ratos. Diferença estatística: \*\*  $P < 0,01$ .

As figuras 39 e 40 apresentam os percentuais de relaxamento produzido pelo Terpy na ausência e na presença (20 min) de glibenclamida (3  $\mu$ M) em preparações pré-contraídas com carbacol.

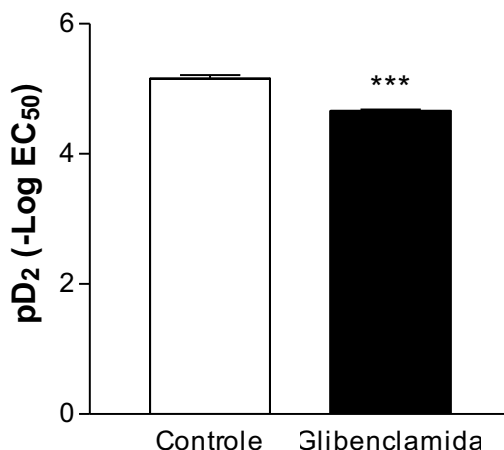
O bloqueador dos canais  $K_{ATP}$  apresentou diminuição significativa ( $P < 0,001$ ) tanto para o efeito máximo, redução de 39% (figura 40), quanto para a potência, redução de 9,7% (figura 41). O  $E_{max}$  na ausência da glibenclamida apresentou valores de  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  e na presença  $59,3 \pm 14,0\%$ ,  $n=5$ . Para o  $pD_2$ , os valores passaram de  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  para  $4,66 \pm 0,043$ ,  $n=5$ .



**Figura 39: Efeito da glibenclamida sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy na presença (20 min) ou ausência de com glibenclamida (3  $\mu$ M) em traquéias de ratos e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



**Figura 40: Efeito máximo do Terpy na presença de glibenclamida.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no  $E_{max}$  do relaxamento provocado pelo Terpy na presença (20 min) ou ausência de glibenclamida (3  $\mu$ M) em traquéia de ratos pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\*  $P < 0,001$ .

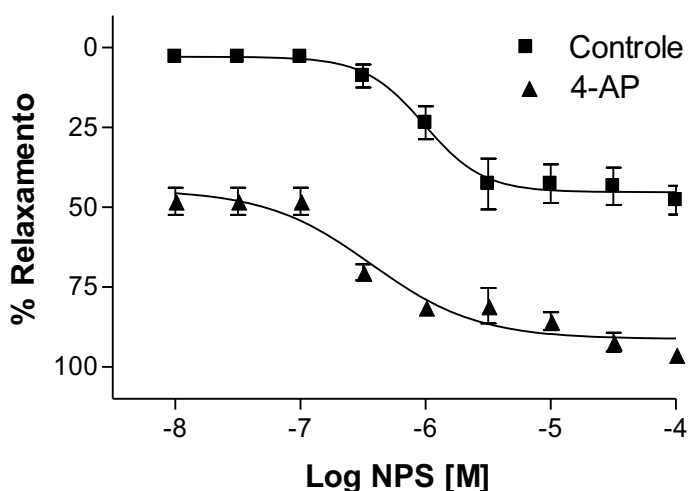


**Figura 41: Potência do Terpy na presença de glibenclamida.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores do  $-\text{Log EC}_{50}$  do Terpy na presença (20 min) ou ausência de glibenclamida (3  $\mu\text{M}$ ) em traquéias de ratos e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\*  $P < 0,001$

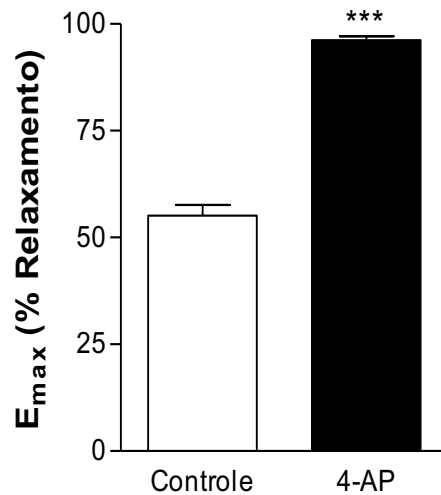
#### 4.6.3 Efeito do bloqueador dos canais de $\text{K}^+$ dependente de voltagem ( $\text{K}_v$ ), 4-aminopiridina (4-AP) sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

Os percentuais de relaxamento produzidos pelo NPS na ausência e na presença (20 min) 4-AP (1 mM) estão apresentados nas figuras 42 e 43.

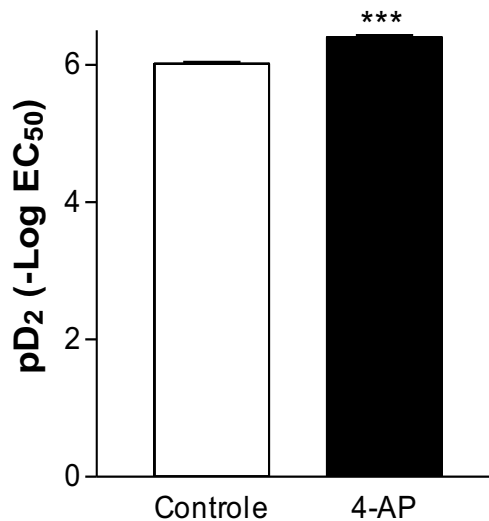
O 4-AP aumentou significativamente ( $P < 0,001$ ) tanto o efeito máximo, aumento de cerca de 74% (figura 43), quanto para a potência, aumento de 5,4% (figura 44). O  $E_{\text{max}}$  na ausência do 4-AP apresentou valores de  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$  e na presença  $96,2 \pm 2,1\%$ ,  $n=5$ . Para o  $pD_2$ , os valores passaram de  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  para  $6,40 \pm 0,067$ ,  $n=5$ .



**Figura 42: Efeito do 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de 4-AP (1 mM) em traquéia de ratos e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



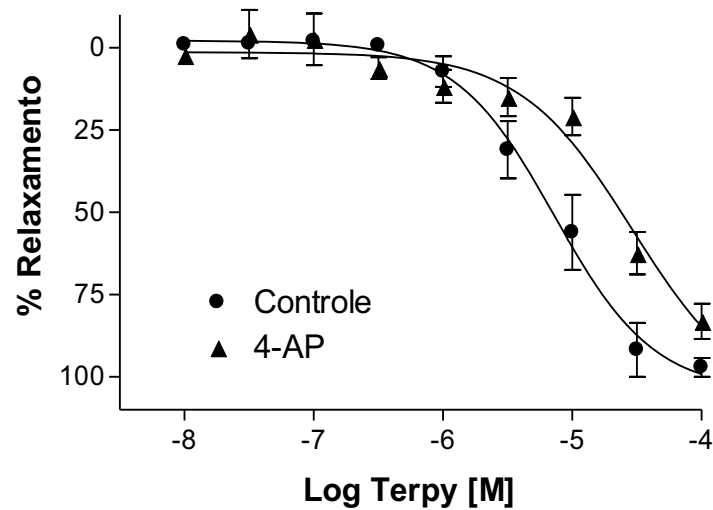
**Figura 43: Efeito máximo de NPS na presença de 4-AP.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no  $E_{max}$  do relaxamento provocado pelo NPS em traquéia de ratos na presença (20 min) ou ausência de 4-AP (1 mM) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\*  $P < 0,001$ .



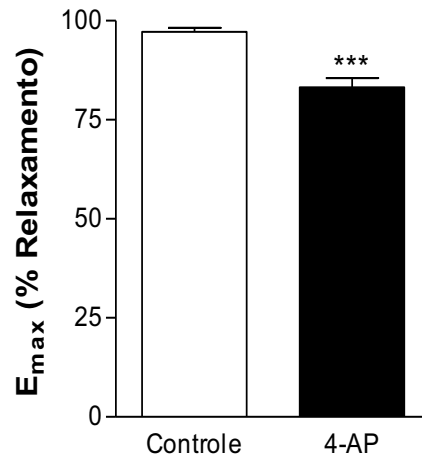
**Figura 44: Potência do NPS na presença de 4-AP.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores do -Log da  $EC_{50}$  do NPS na presença (20 min) ou ausência de com 4-AP (1 mM) em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\*  $P < 0,001$ .

As figuras 45 e 46 apresentam o percentual de relaxamento produzido pelo Terpy na ausência e na presença (20 min) de 4-AP (1 mM) em preparações pré-contraídas com carbacol.

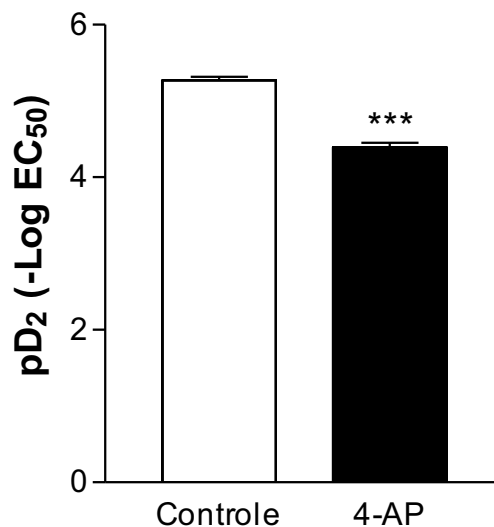
O 4-AP induziu diminuição significativa ( $P < 0,01$ ) tanto para o efeito máximo, redução de 9,2% (figura 45) quanto para a potência ( $P < 0,001$ ), redução de 15% (figura 47). O  $E_{max}$  na ausência do 4-AP apresentou valores de  $97,2 \pm 2,82\%$ ,  $n=7$  e na presença  $88,2 \pm 2,4\%$ ,  $n=4$ . Para o  $pD_2$ , os valores passaram de  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  para  $4,39 \pm 0,12$ ,  $n=4$ .



**Figura 45: Efeito do 4-AP sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy na presença (20 min) ou ausência de 4-AP (1 mM) em traquéias e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



**Figura 46: Efeito máximo do Terpy na presença de 4-AP.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no E<sub>max</sub> do relaxamento provocado pelo Terpy em traquéias de ratos na presença (20 min) ou ausência de 4-AP (1 mM) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\* P < 0,01.

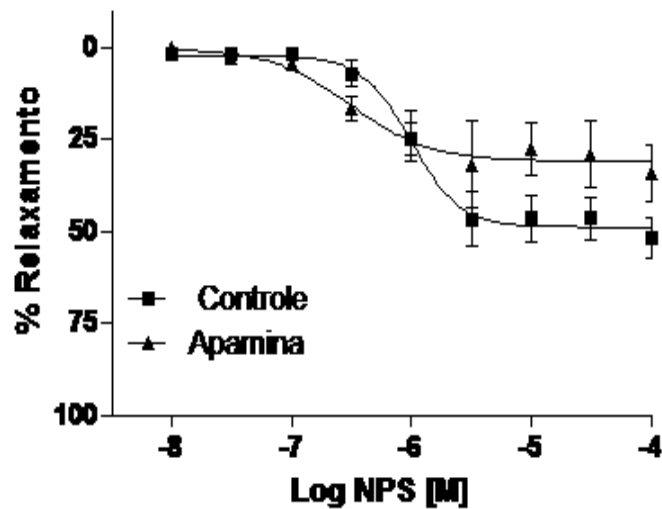


**Figura 47: Potência do Terpy na presença de 4-AP.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores do pD<sub>2</sub> do Terpy em traquéias de ratos após na presença (20 min) ou ausência de 4-AP (1 mM) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\* P < 0,001.

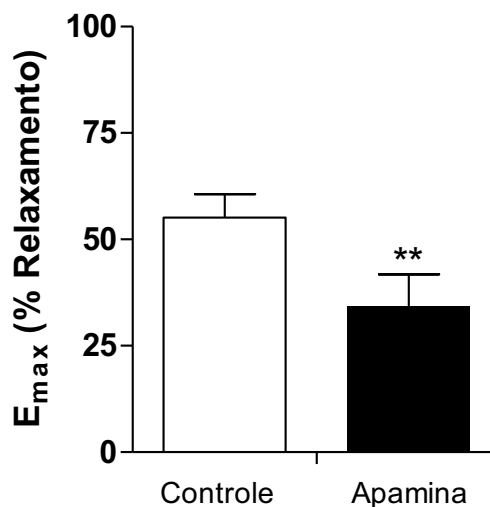
#### 4.6.4 Efeito do bloqueador dos canais de $K^+$ ativados por $Ca^{2+}$ de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ), Apamina (APA), sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

O percentual de relaxamento produzido pelo NPS na ausência e na presença (20 min) APA ( $0,5 \mu M$ ) estão apresentados nas figuras 48 e 49.

A APA reduziu significativamente ( $P < 0,01$ ) o efeito máximo do NPS em cerca de 38% (figura 49). O  $E_{max}$  na ausência do bloqueador foi  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$  e na presença  $34,3 \pm 7,5\%$ ,  $n=4$ . Para o  $pD_2$ , não houve variação significativa, os valores na ausência do APA foram de  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  e na presença  $5,72 \pm 0,73$ ,  $n=4$ .

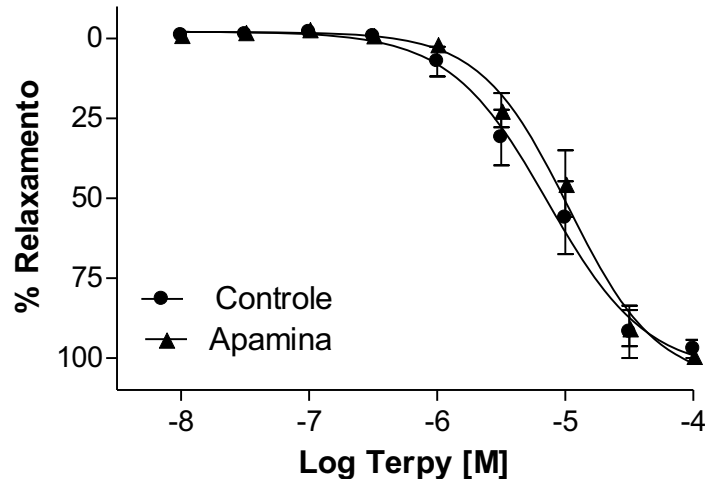


**Figura 48: Efeito da apamina sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de APA ( $0,5 \mu M$ ) em traquéia de ratos e pré-contraídas com carbachol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem



**Figura 49: Efeito máximo de NPS na presença de apamina.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no  $E_{max}$  do relaxamento provocado pelo NPS em traquéia de ratos na presença (20 min) ou ausência de APA ( $0,5 \mu M$ ) e pré-contraídas com carbachol. Diferença estatística: \*\*  $P < 0,01$ .

A figura 50 apresenta o efeito relaxante produzido pelo Terpy na ausência e na presença (20 min) da APA (0,5  $\mu$ M). A presença desse inibidor não modificou o perfil de relaxamento do Terpy ou mesmo a sua potência. Os valores de  $E_{max}$  na ausência da APA foram  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  e na presença  $99,3 \pm 1,5\%$ ,  $n=4$ . Os Valores de potência na ausência da APA foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  e na presença  $4,97 \pm 0,11$ ,  $n=4$ .



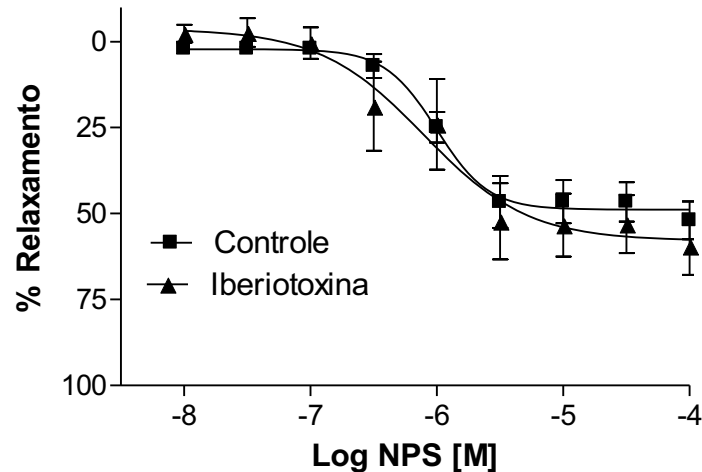
**Figura 50: Efeito da apamina sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy antes na presença (20 min) ou ausência de APA (0,5  $\mu$ M) em traquéias e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

#### 4.6.5 Efeito do bloqueador dos canais de $K^+$ ativados por $Ca^{2+}$ de alta condutância ( $BK_{Ca}$ ), Iberiotoxina (IBTX), sobre o relaxamento induzido pelo NPS e pelo Terpy em traquéia

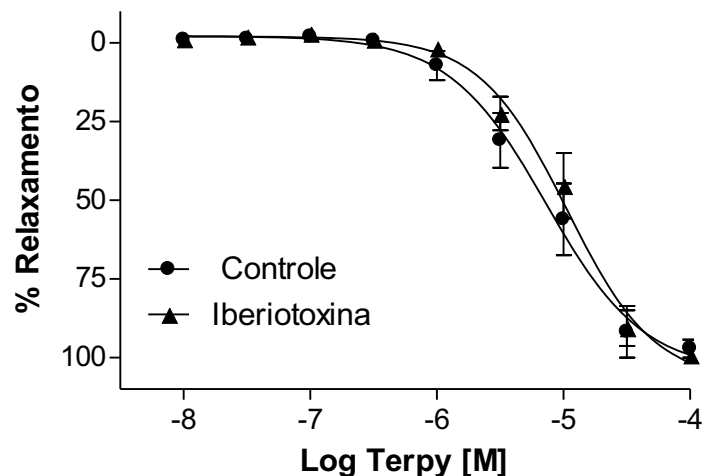
As figuras 51 e 52 apresentam o percentual de relaxamento produzido pelo NPS e pelo Terpy, respectivamente, na ausência e na presença (20 min) de IBTX (0,1  $\mu$ M) em preparações pré-contraídas com carbacol.

A presença da IBTX não modificou o perfil de relaxamento de ambos doadores, não havendo variação significativa de  $E_{max}$  e  $pD_2$ . De acordo com a figura 51, o  $E_{max}$  do NPS na ausência de IBTX apresentou valores de  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$  e na presença  $59,5 \pm 8,3\%$ ,  $n=4$ . Os valores de  $pD_2$  na ausência do bloqueador foram de  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  e na presença  $6,10 \pm 0,21$ ,  $n=4$ .

Como observado na figura 52 o  $E_{max}$  do Terpy na ausência de IBTX foi  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  e na presença  $99,3 \pm 1,5\%$ ,  $n=4$ . Para o  $pD_2$ , os valores passaram de  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  para  $4,98 \pm 0,11$ ,  $n=4$ .



**Figura 51: Efeito da iberiotoxina sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de IBTX (0,1  $\mu$ M) em traquéia de ratos e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem



**Figura 52: Efeito da iberiotoxina sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy na presença (20 min) ou ausência de IBTX (0,1  $\mu$ M) em traquéias e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

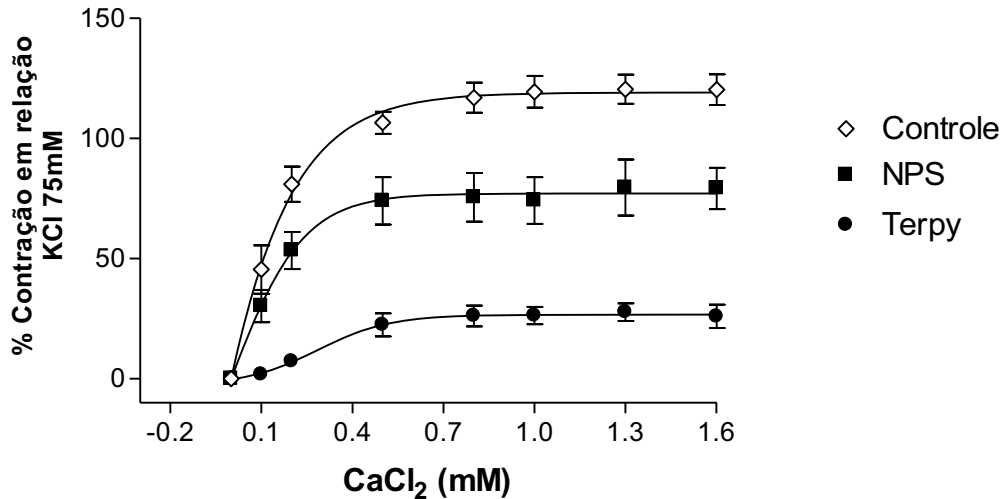
#### 4.7 EFEITO DO INFLUXO DE $Ca^{2+}$ SOBRE O RELAXAMENTO INDUZIDO PELO NPS E PELO TERPY EM TRAQUÉIAS

##### 4.7.1 Em presença de carbacol

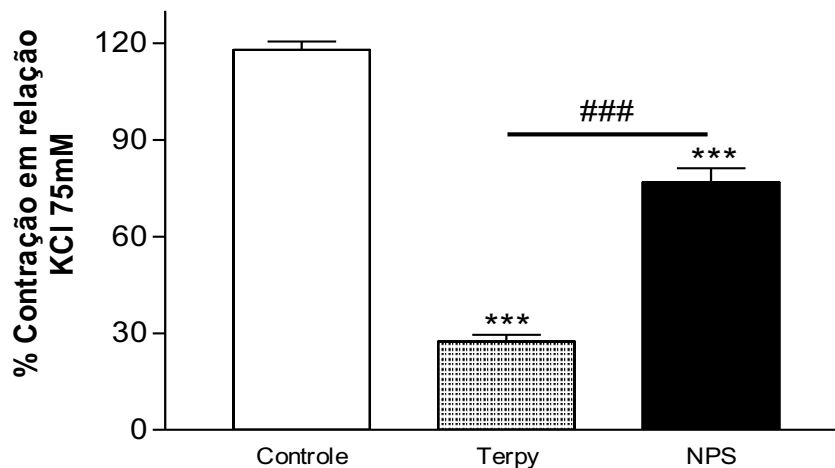
A resposta contrátil ao aumento subsequente de  $CaCl_2$  na solução de Krebs em traquéia (após a depleção dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$ ) na presença de carbacol (0,5  $\mu$ M) pode ser vista nas figuras 53 e 54.

A resposta contrátil (% dos valores contráteis obtidos com KCl 75 mM) do grupo controle apresentou valores de  $E_{max}$   $118 \pm 6,0\%$ ,  $n=5$ . O grupo incubado com

NPS 100  $\mu\text{M}$  por 20 min apresentou uma redução da contração máxima de 35%, ( $77,0 \pm 9,6\%$ ,  $n=5$ ) e o grupo incubado com Terpy 100  $\mu\text{M}$  por 20 min uma redução de 77% ( $27,4 \pm 4,1\%$ ,  $n=4$ ). Essas reduções no efeito máximo são significativas ( $P<0,001$ ) e estão apresentadas na figura 54.



**Figura 53: Curva de contração para  $\text{Ca}^{2+}$  em presença de carbacol em traquéias isoladas de ratos.** A figura representa a resposta contrátil a concentrações cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  na ausência (controle) e na presença (20 min) de NPS ou Terpy 100  $\mu\text{M}$  em presença de carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM da resposta contrátil expressos em porcentagem em relação à máxima contração exercida por 75 mM de KCl.

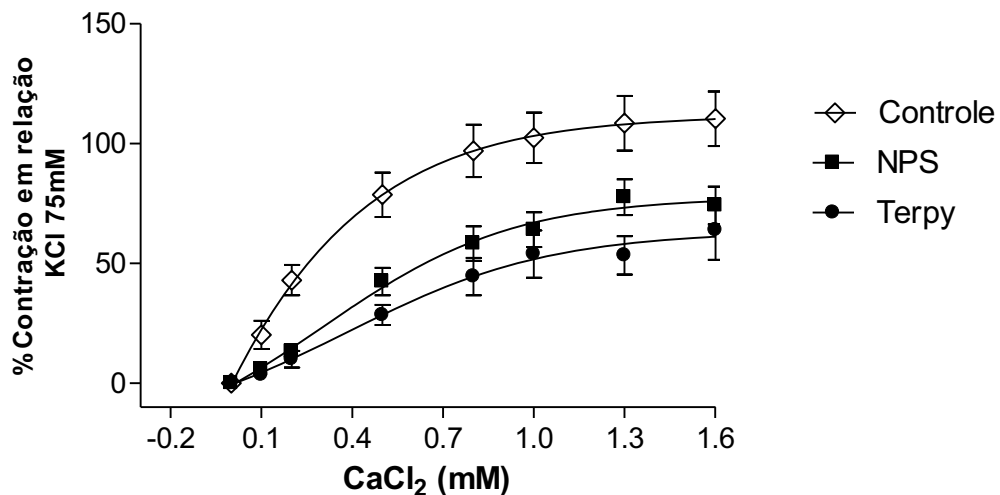


**Figura 54: Efeito máximo da curva de contração para  $\text{Ca}^{2+}$ .** Resposta contrátil máxima a concentrações cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  na ausência (controle) e na presença (20 min) de NPS ou Terpy (100  $\mu\text{M}$ ) em presença de carbacol. As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM da resposta contrátil expressos em porcentagem em relação à máxima contração exercida por 75 mM de KCl. Diferença estatística: \*\*\*  $P<0,001$  em relação ao controle; ###  $P<0,001$  comparação entre NPS e Terpy.

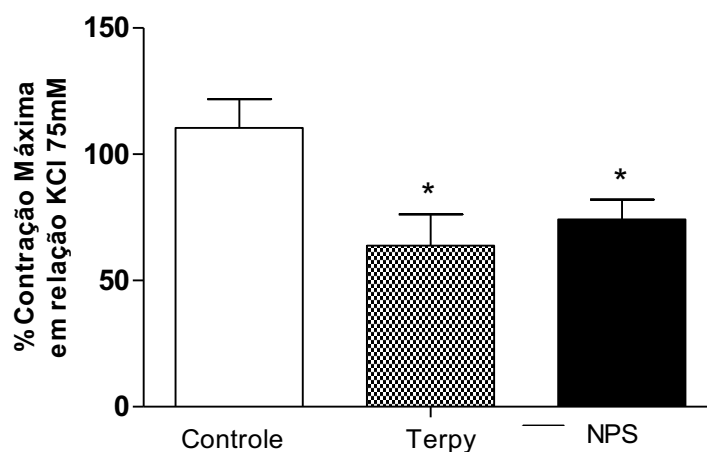
#### 4.7.2 Em presença de KCl 75 mM

A resposta contrátil ao aumento subsequente de  $\text{CaCl}_2$  na solução de Krebs em traquéia na presença de KCl (75 mM) pode ser vista nas figuras 55 e 56.

A resposta contrátil (% dos valores contráteis obtidos com KCl 75 mM) do grupo controle apresentou valores de  $E_{\text{max}}$   $110 \pm 11,4\%$ ,  $n=5$ . O grupo incubado com NPS 100  $\mu\text{M}$  por 20 min apresentou redução significativa ( $P<0,05$ ) de 33% na contração máxima ( $74,0 \pm 7,8\%$ ,  $n=5$ ) e o grupo incubado com Terpy 100  $\mu\text{M}$  por 20 min uma redução significativa ( $P<0,05$ ) de 42% ( $64,0 \pm 12,4\%$ ,  $n=4$ ).



**Figura 55: Curva de contração para  $\text{Ca}^{2+}$  em presença de KCl 75 mM em traquéias isoladas de ratos.** A figura representa a resposta contrátil a concentrações cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  na ausência (controle) e na presença (20 min) de NPS ou Terpy 100  $\mu\text{M}$  em presença de solução de Krebs com KCl 75 mM. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM da resposta contrátil expressos em porcentagem em relação à máxima contração exercida por 75 mM de KCl.

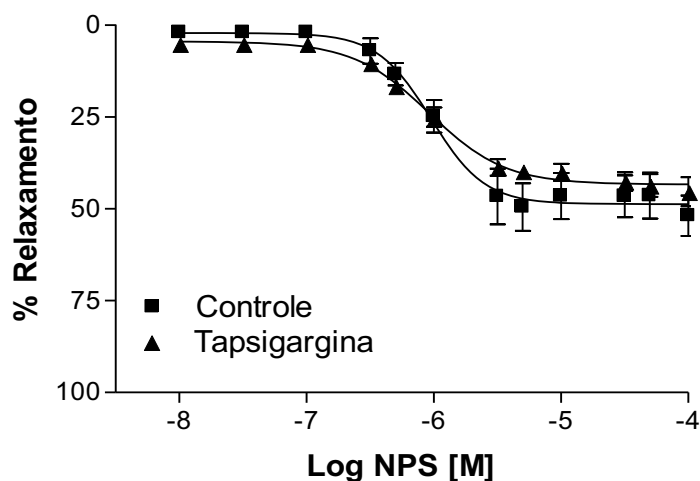


**Figura 56: Efeito máximo da curva de contração para  $\text{Ca}^{2+}$ .** Resposta contrátil máxima a concentrações cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  na ausência (controle) e na presença (20 min) de NPS ou Terpy (100  $\mu\text{M}$ ) em solução de Krebs contendo KCl (75 mM). As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM da resposta contrátil expressos em porcentagem em relação à máxima contração exercida por 75 mM de KCl. Diferença estatística: \*  $P<0,05$

#### 4.8 EFEITO DA CAPTAÇÃO DE $Ca^{2+}$ INTRACELULAR DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO E DA MITOCÔNDIA

Os percentuais de relaxamento produzido pelo NPS ou Terpy na ausência e na presença (20 min) do inibidor da bomba de  $Ca^{2+}$ -ATPase retículo sarcoplasmático tapsigargina (1  $\mu$ M) estão apresentados na figura 57 e 58, respectivamente.

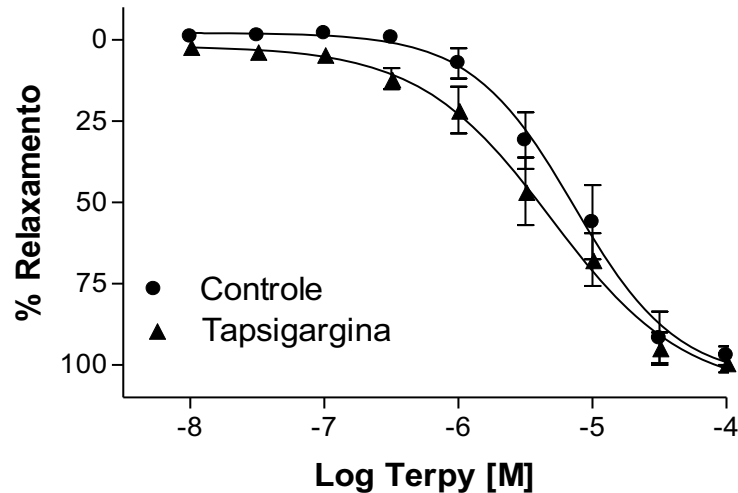
A tapsigargina não provocou variação significativa nem para a resposta máxima nem para o  $pD_2$  do NPS. Os valores de  $E_{max}$  na ausência do inibidor foram  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$ , e na presença deste  $45,4 \pm 3,9\%$ ,  $n=5$ . Na ausência de tapsigargina os valores de  $pD_2$  encontrados foram  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  e na presença  $6,05 \pm 0,11$ ,  $n=5$



**Figura 57: Efeito da tapsigargina sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de tapsigargina (1  $\mu$ M) em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

Também não houve variação significativa nem para a resposta máxima nem para o  $pD_2$  do Terpy em presença de tapsigargina. Os valores de  $E_{max}$  do Terpy passaram de  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  para  $99,4 \pm 3,0\%$ ,  $n=6$ . Os valores de  $pD_2$  na ausência do inibidor foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  e na presença  $5,34 \pm 0,17$ ,  $n=6$ .

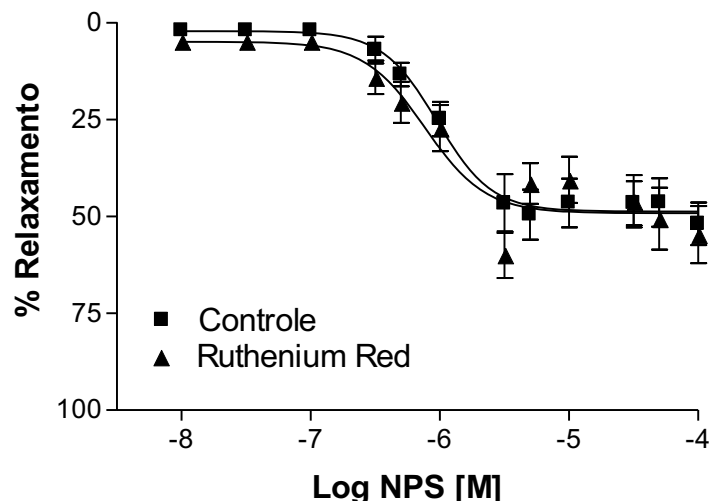
Portanto, a sobreposição das curvas apresentadas nas figuras 57 e 58 sugerem que a captação de cálcio pela bomba  $Ca^{2+}$ -ATPase não interfere no mecanismo celular de relaxamento do músculo liso de traquéia gerado pelo Terpy ou NPS.



**Figura 58: Efeito da tapsigargina sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy na presença (20 min) ou ausência de tapsigargina (1  $\mu$ M) em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

Os percentuais de relaxamento produzido pelo NPS ou Terpy na ausência e na presença (20 min) do inibidor do uniporter da mitocôndria Ruthenium Red (10  $\mu$ M) estão apresentados na figura 59 e 60, respectivamente.

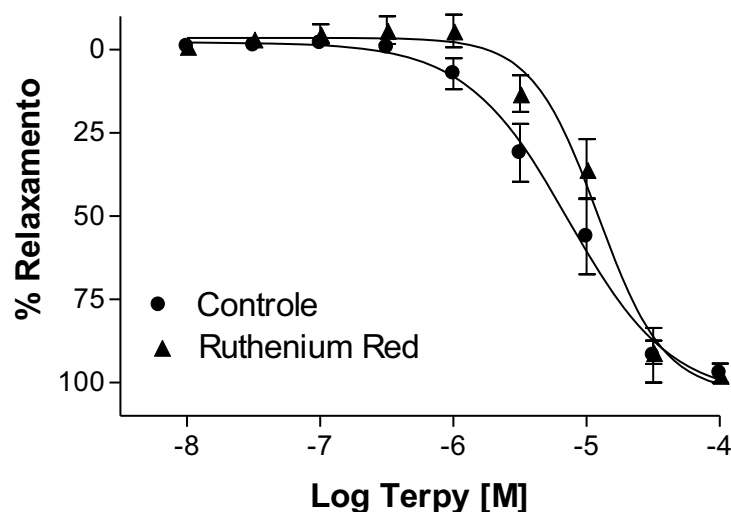
Esse inibidor não provocou variação significativa nem para a resposta máxima nem para o  $pD_2$  do NPS. Os valores de  $E_{max}$  na ausência do inibidor foram  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$ , e na presença deste  $54,7 \pm 7,4\%$ ,  $n=4$ . Na ausência de ruthenium red os valores de  $pD_2$  encontrados foram  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  e na presença  $6,13 \pm 0,09$ ,  $n=4$ .



**Figura 59: Efeito do Ruthenium Red sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS na presença (20 min) ou ausência de Ruthenium Red (10  $\mu$ M) em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

Da mesma maneira, não houve variação significativa nem para a resposta máxima nem para o  $pD_2$  do Terpy em presença de Ruthenium Red (figura 60). Os valores de  $E_{max}$  do Terpy passaram de  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  para  $97,7 \pm 1,3\%$ ,  $n=5$ . Os valores de  $pD_2$  na ausência do inibidor foram  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  e na presença  $4,94 \pm 0,07$ ,  $n=5$ .

Portanto, a sobreposição das curvas apresentadas nas figuras 58 e 59 sugerem que a captação de cálcio pelo uniporter mitocondrial não interfere no mecanismo celular de relaxamento do músculo liso de traquéia gerado pelo Terpy ou NPS.

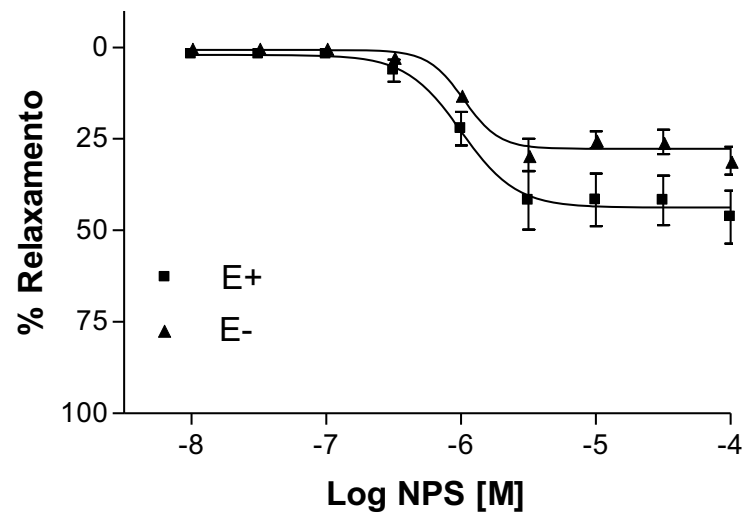


**Figura 60: Efeito do Ruthenium Red sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para na presença (20 min) ou ausência de Ruthenium Red ( $10 \mu M$ ) em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

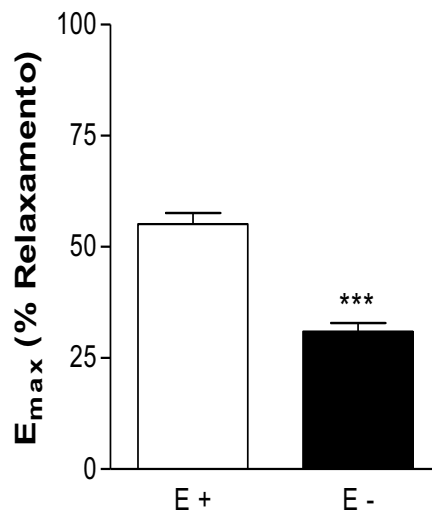
#### 4.9 EFEITO DO EPITÉLIO SOBRE O RELAXAMENTO INDUZIDO PELO NPS E PELO TERPY EM TRAQUÉIAS

As figuras 61 e 62 representam as curvas de relaxamento produzidas pelo NPS em traquéias pré-contraídas com carbacol ( $0,5 \mu M$ ) intactas (E+) e sem o epitélio (E-).

Para o NPS o  $E_{max}$  das traquéias intactas foi  $55,1 \pm 5,5\%$ ,  $n=5$  e para as sem epitélio  $31,0 \pm 3,8\%$ ,  $n=4$ , uma redução de 44%, portanto, há redução significativa ( $P < 0,001$ ). Para o  $pD_2$ , os valores passaram de  $6,07 \pm 0,03$ ,  $n=5$  para  $6,12 \pm 0,09$ ,  $n=4$ , sem variação significativa.

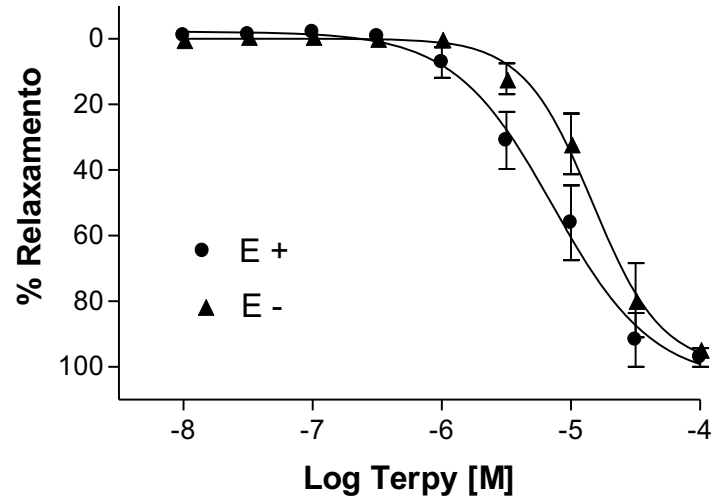


**Figura 61: Participação do epitélio sobre o relaxamento induzido pelo NPS em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol.** Curvas concentração-efeito cumulativas para NPS em traquéias intactas (E+) e sem o epitélio (E-) e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.



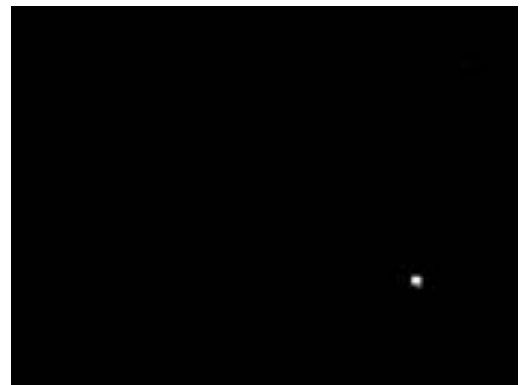
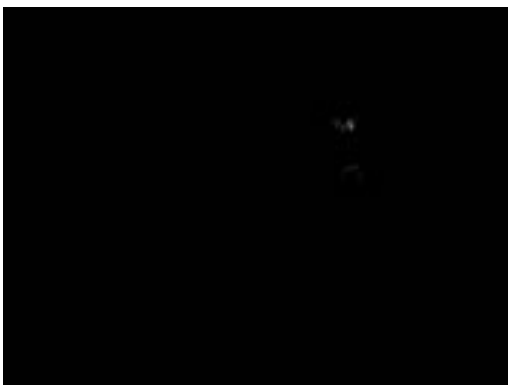
**Figura 62: Participação do epitélio no efeito máximo do NPS.** Barras verticais representam a média  $\pm$  EPM dos valores obtidos no  $E_{max}$  provocado pelo NPS em traquéias intactas (E+) e sem o epitélio (E-) e pré-contraídas com carbacol. Diferença estatística: \*\*\*  $P < 0,001$

Para o Terpy, a figura 63, representa a participação do epitélio no relaxamento de traquéias. O efeito máximo das preparações com epitélio intacto foi  $97,2 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$  e as preparações sem epitélio apresentou resposta máxima de  $96,6 \pm 2,2\%$ ,  $n=4$ . Esses dados não apresentam variação significativa, assim como os valores de  $pD_2$ , que passaram de  $5,16 \pm 0,14$ ,  $n=7$  para  $4,82 \pm 0,13$ ,  $n=4$ .



**Figura 63: Participação do epitélio sobre o relaxamento induzido pelo Terpy em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terpy em traquéias intactas (E+) e sem o epitélio (E-) e pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

A figura 64 apresenta fotografias de corte histológico tirada de microscópio ótico no aumento original de 40X. A fotografia **A** é um corte de traquéia de rato revestida por epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado e a **B** evidencia-se a ausência de epitélio. As figuras **A** e **B** apresentam uma camada de músculo liso (ML) caracterizada por células alongadas e núcleo achatado. No caso da foto **A**, essa camada se encontra imediatamente abaixo do epitélio. Abaixo do ML encontra-se uma espessa camada de cartilagem hialina. Posterior a essa camada encontra-se outra camada de ML e de cartilagem com inúmeros fibroblastos e fibras colágenas.

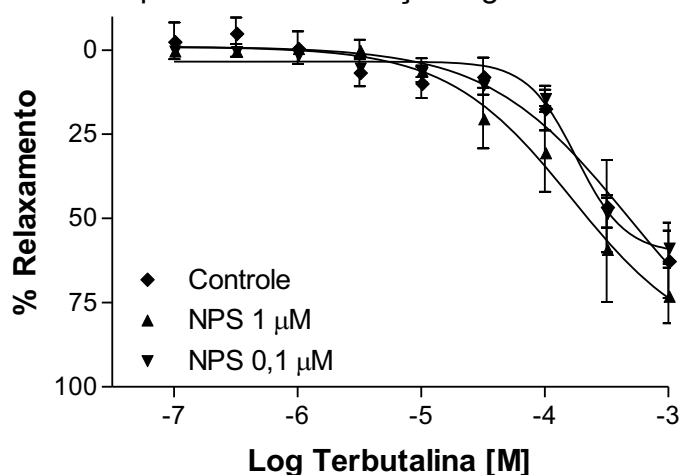


**Figura 64 A e B: Fotomicroscopia de corte histológico transversal de tecido traqueal de rato evidenciando presença (A) e ausência (B) de epitélio de revestimento.** Coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E); aumento original de 40X. E - epitélio; ML - músculo liso.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DE UM POSSÍVEL EFEITO SINÉRGICO COM TERBUTALINA

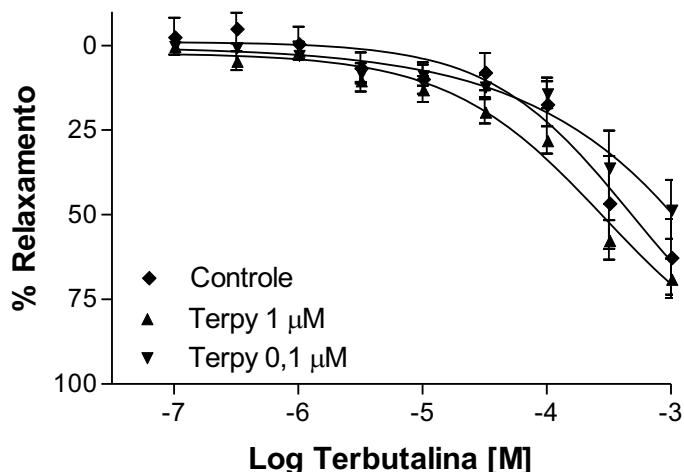
As figuras 65 e 66 representam as curvas de relaxamento produzidas pela terbutalina em traquéias pré-contraídas com carbacol (0,5  $\mu$ M) com 1  $\mu$ M ou 0,1  $\mu$ M de NPS e Terpy respectivamente.

O relaxamento máximo da terbutalina em traquéias de ratos foi de 70,6%  $\pm$  9,8%, n=4. Quando a curva para terbutalina foi feita na presença de 1  $\mu$ M de NPS, o  $E_{max}$  foi 73,0%  $\pm$  8,3%, n=4 e na presença 0,1  $\mu$ M de NPS o  $E_{max}$  foi 58,6%  $\pm$  4,90%, n=5. Para a potência da terbutalina os valores encontrados foram 3,43  $\pm$  0,21, n=4. Quando a curva para terbutalina foi feita na presença de 1  $\mu$ M de NPS, o  $pD_2$  foi 3,95  $\pm$  0,31, n=4 e na presença 0,1  $\mu$ M de NPS o  $pD_2$  foi 3,74  $\pm$  0,04, n=5. Essas comparações não apresentaram variação significativa.



**Figura 65: Sinergismo: efeito do NPS sobre o relaxamento induzido pela Terbutalina em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terbutalina na ausência ou presença (20 min) de NPS (1  $\mu$ M e 0,1  $\mu$ M) em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

O relaxamento máximo da terbutalina em traquéias de ratos foi de 70,6%  $\pm$  9,8%, n=4. Quando a curva para terbutalina foi feita na presença de 1  $\mu$ M de Terpy, o  $E_{max}$  foi 67,2%  $\pm$  4,5%, n=5 e na presença 0,1  $\mu$ M de Terpy o  $E_{max}$  foi 60,0%  $\pm$  5,5%, n=4. Para a potência da terbutalina os valores encontrados foram 3,43  $\pm$  0,21, n=4. Quando a curva para terbutalina foi feita na presença de 1  $\mu$ M de Terpy, o  $pD_2$  foi 3,62  $\pm$  0,26, n=5 e na presença 0,1  $\mu$ M de Terpy o  $pD_2$  foi 3,60  $\pm$  0,09, n=4. Essas comparações não apresentaram variação significativa.

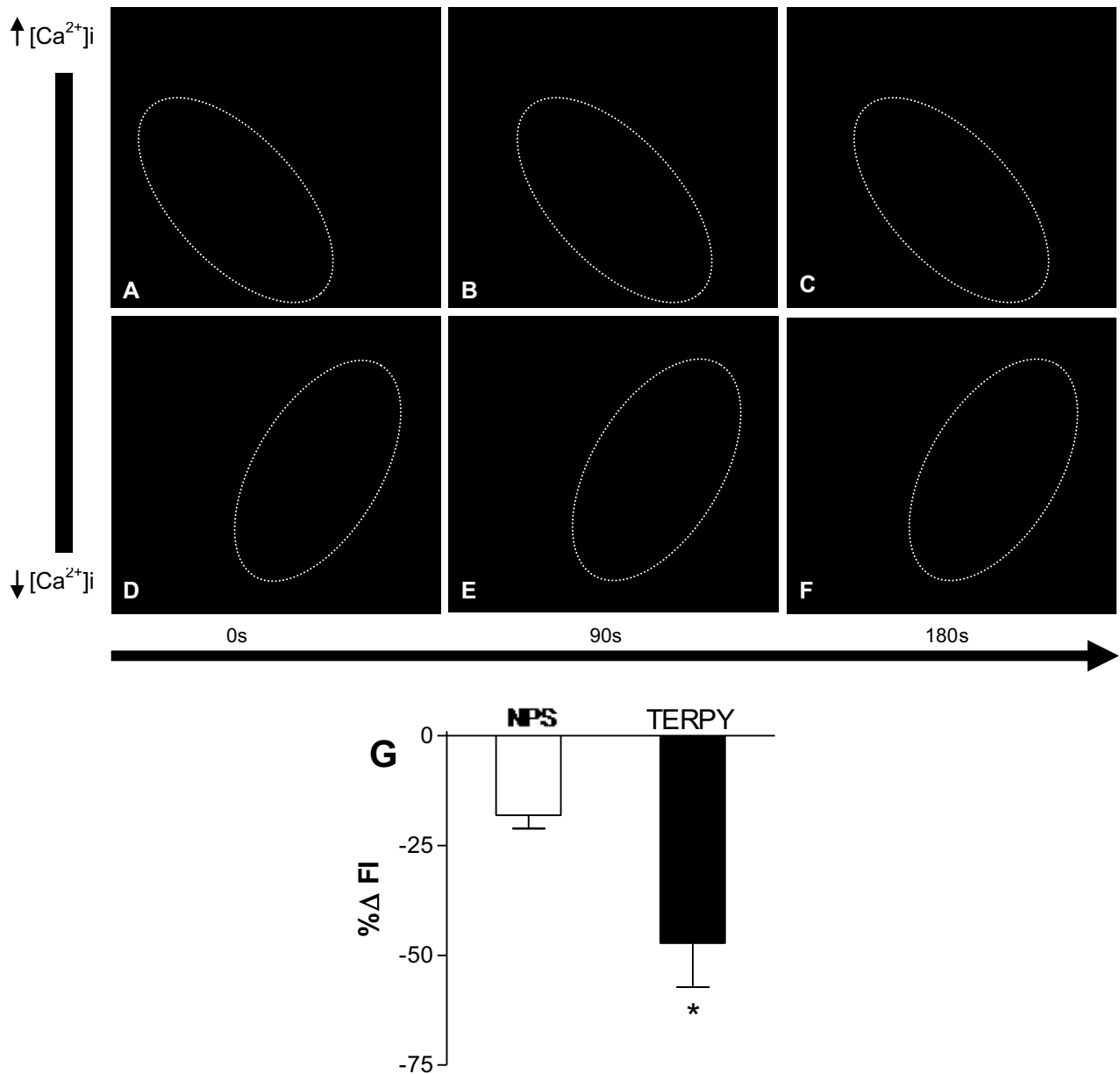


**Figura 66: Sinergismo: efeito do Terpy sobre o relaxamento induzido pela Terbutalina em traquéias isoladas de ratos.** Curvas concentração-efeito cumulativas para Terbutalina na ausência ou presença de Terpy (1 µM e 0,1 µM) em traquéias de ratos pré-contraídas com carbacol. Os pontos representam médias  $\pm$  EPM do efeito relaxante expressos em porcentagem.

#### 4.11 MEDIDAS DA CONCENTRAÇÃO CITOSÓLICA DE $Ca^{2+}$ EM ANÉIS DE TRAQUÉIAS DE RATO POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Usando microscopia confocal, examinou-se o efeito do Terpy e do NPS (100 µM) sobre a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em músculo liso traqueal de ratos na presença de sonda sensível ao cálcio, Fluo 3-AM. A figura 67 apresenta a redução da fluorescência do Fluo-3 após a adição de Terpy ou NPS.

A redução da  $[Ca^{2+}]_i$  em resposta ao Terpy foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que a resposta ao NPS, uma redução de 62%. A diminuição da intensidade de fluorescência (%  $\Delta FI$ ) na presença de NPS foi de  $-18,1 \pm 3,09\%$ ,  $n=4$  e na presença de Terpy  $-47,2 \pm 9,97\%$ ,  $n=4$ .



**Figura 67: Redução da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  induzido pelo Terpy ou NPS em músculo liso traqueal de ratos.** A fluorescência do Fluo-3 em traquéias de ratos está apresentada no tempo igual a 0 (antes da adição dos doadores de NO), 90 e 180 s após a adição do Terpy (100 μM, A, B, C, respectivamente) ou NPS (100 μM, D, E, F, respectivamente). (G) Indica a redução da  $[Ca^{2+}]_i$  depois de 180s (% ΔFI). Diferença estatística \*P <0,05.

## 5 DISCUSSÃO

O NO exerce importantes funções na modulação do tônus vascular, como ativador endógeno da enzima GCs no citoplasma das células do músculo liso, onde tal ativação produz o segundo mensageiro GMPc, importante agente vasodilatador, que em cascata ativa a PKG. A PKG é capaz de fosforilar várias proteínas que podem levar à redução do  $[Ca^{2+}]_i$ , levando ao relaxamento (ARNOLD et al., 1977; MCDANIEL et al., 1992). Stuart-Smith et al. (1998), indicam que em traquéias de suínos o mecanismo pelo qual o NO leva ao relaxamento pode estar relacionado com o aumento de GMPc. Porém, este relaxamento não é completamente dependente da via GC/GMPc.

O NO também exerce efeitos celulares independentes do GMPc, como ativação da bomba  $Na^+/K^+$ ATPase, modulação de canais para  $K^+$  e redução da sensibilidade a agentes vasoconstritores (BOLOTINA et al., 1994; KANAGY et al., 1996; MISTRY & GARLAND, 1998; HOMER & WANSTALL, 2000).

Particularmente no sistema respiratório, o NO promove o relaxamento das vias aéreas (ARNOLD et al., 1984), atuando especificamente sobre o músculo liso traqueal (ZHOU & TORPHY, 1991; GASTON et al., 1994; STUART-SMITH et al., 1994) e a maior fonte de NO nas vias aéreas é o epitélio (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998).

Existem controvérsias quanto à utilização de NO no tratamento de doenças do sistema respiratório. Alguns pesquisadores defendem sua utilização por observarem que o NO leva à broncodilatação em casos de asma (HÖGMAN et al., 1993; KACMAREK et al., 1996; REDINGTON, 2006) e outros não favoráveis por observarem que o NO exógeno não modifica o tônus das vias aéreas de pacientes asmáticos (PFEFFER et al., 1996).

Na tentativa de contribuir para essa discussão, o presente trabalho comparou o efeito relaxante de dois compostos doadores de NO,  $[Ru(terpy)(bdq)NO^+]^{3+}$  (Terpy) e Nitroprussiato de sódio (NPS) em traquéias isoladas de ratos. Esses compostos tem sido estudados em artérias isoladas de ratos (BONAVENTURA et al., 2007), entretanto, estudos em musculatura lisa não vascular ainda não haviam sido realizados. Com este trabalho, foi possível verificar que o mecanismo de ação do Terpy em traquéias isoladas exibe algumas particularidades

em relação ao seu mecanismo de ação em vasos isolados e também em relação ao NPS.

Um dos propósitos desse estudo foi avaliar a indução da resposta relaxante em traquéias isoladas tanto do NPS quanto do Terpy a partir da pré-contracção com agonista colinérgico ou após despolarização da membrana com solução de KCl. Foi observado que os dois doadores de NO foram capazes de relaxar traquéias isoladas de ratos de forma concentração-dependente para essas duas formas de contracção. Para a pré-contracção promovida pelo agonista colinérgico carbacol, o relaxamento promovido pelo Terpy foi mais eficaz em comparação com o relaxamento promovido pelo NPS.

O relaxamento máximo produzido pelo Terpy em traquéias isoladas de ratos, pré-contráidas com carbacol, apresentou-se por volta de 100%. Entretanto, para o NPS, o efeito máximo ficou por volta de 55%. O resultado com o NPS é semelhante aos achados de Toque et al. (2010), que observaram que o NPS apresenta efeito máximo por volta de 44% em traquéias isoladas de ratos pré-contráidas com carbacol. Em traquéias isoladas de cobaias, Hjoberg et al. (1999), observaram que o efeito máximo do NPS foi de aproximadamente 80%. Diante disso, o efeito máximo do NPS em traquéias parece variar de acordo com as diferentes condições experimentais e espécies estudadas.

Os prostanóides derivados do ácido araquidônico via COX exercem efeitos sobre o tônus do músculo liso por mecanismos que levam a alterações na concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico. A participação dessas substâncias poderia contrabalancear os mecanismos de relaxamento dos dois doadores de NO. Estudos tem mostrado que prostaglandinas modulam o tônus das vias aéreas de camundongos, (BALZARY & COCKS, 2006), coelhos (LARSEN et al., 2007), cobaias (SHAAFSMA et al., 2007) e ratos (de SOUSA et al., 2010). Entretanto, nossos resultados com indometacina (inibidor não seletivo da COX) mostraram uma sobreposição das curvas de relaxamento tanto do NPS quanto do Terpy com as curvas controles (ausência de indometacina), não havendo variação na potência nem na eficácia das substâncias testadas. Esses dados indicam que os derivados do ácido araquidônico metabolizados via COX não interferem no relaxamento do músculo liso traqueal de ratos induzido por ambos doadores de NO. Resultados semelhantes foram encontrados por Marques et al. (1998), ao estudarem o mecanismo celular de relaxamento do NPS em traquéias de cobaias, onde a

indometacina não alterou o padrão de relaxamento para o NPS e por Toque et al. (2010), ao estudarem o efeito relaxante de uma análogo da enzima GCs em traquéias isoladas de ratos, em que a presença da indometacina não modificou o perfil de relaxamento.

Estudos em músculo liso traqueal e brônquico mostram que o principal alvo do NO é a enzima GCs (ELLIS, 1997; HWANG et al., 1998). Entretanto, alguns estudos sugerem que o NO pode causar relaxamento independente da ativação de GMPc (STUART-SMITH et al., 1994; PERKINS et al., 1998; REDINGTON, 2006), além da ativação dos canais para  $K^+$  (BOLOTINA et al., 1994; PLANE et al., 1996; MISTRY & GARLAND, 1998; HOMER & WANSTALL, 2000), levando à hiperpolarização e inibição de canais para  $Ca^{2+}$  do tipo L (MIYOSHI et al., 1994). O equilíbrio na produção de GMPc se dá pela ação da GCs (que transforma GTP em GMPc) e das PDEs (que degrada GMPc em GMP).

Neste trabalho, a via GCs/GMPc demonstrou ser a via mais importante para o mecanismo celular de relaxamento do NPS. Com a inibição da GCs pelo ODQ, tanto a potência quanto a eficácia desse fármaco foram diminuídas, provavelmente por não haver produção suficiente de GMPc. A ativação da GCs pelo NO foi sugerida como mecanismo de ação do NPS em traquéias de ratos (TOQUE et al., 2010) e em traquéia de cobaias (ELLIS, 1997; HWANG et al., 1998, 1999). Outros estudos também tem demonstrado que alguns doadores de NO, diferentes do NPS, também atuam através da via GCs/GMPc em traquéias isoladas de cobaias e cães, pois em presença de ODQ, o relaxamento máximo dessas drogas foi reduzido (MANG & KILBINGER, 2000; KWAK et al., 2006).

Nossos experimentos com o inibidor não seletivo das PDEs, IBMX, corroboram com a suposição de que o relaxamento induzido pelo NPS se dá pela ativação da via GCs/GMPc, pois com a menor degradação de GMPc induzida pelo IBMX, tanto a potência quanto a eficácia do NPS foram aumentados. Estudos demonstraram que as várias isoformas da PDEs foram identificadas no músculo liso respiratório (BARNES, 1995; RABE et al., 1995) e que a inibição destas pode levar ao relaxamento do músculo liso traqueal em cães e cobaias (TANAKA et al., 1991; ZHOU & TORPHY, 1991; TURNER et al., 1994; BERNAREGGI et al., 1999).

Entretanto, para o Terpy, a via GCs/GMPc parece não participar do mecanismo celular de relaxamento já que não houve variação da resposta máxima quando a GCs foi inibida pelo ODQ ou após inibição das PDEs pelo IBMX. Estes

dados são diferentes dos resultados relatados por Bonaventura et al. (2007), em artéria de ratos, onde o ODQ reduz o efeito relaxante do Terpy, mostrando uma maior dependência dessa via para o relaxamento em músculo liso vascular, diferente dos resultados desse trabalho em músculo liso não vascular.

Quando as preparações de traquéias foram pré-contraídas com solução de KCl 75 mM, a eficácia no relaxamento dos dois doadores estudados foi semelhante entre si. Comparando o relaxamento máximo do NPS diante da contração do carbacol e da solução de KCl observamos que o relaxamento não foi alterado. Entretanto, quando comparamos o relaxamento máximo do Terpy observamos uma grande redução no  $E_{max}$  para contração com solução de KCl 75 mM. Portanto, a despolarização de membrana prejudica muito o relaxamento induzido pelo Terpy, mostrando que a ativação dos canais de  $K^+$  é uma via importante no efeito deste composto.

Fisiologicamente, os canais de  $K^+$  exercem o seu efeito permitindo o efluxo de íons  $K^+$  do interior da célula muscular através da membrana plasmática com a finalidade de manter o equilíbrio entre cargas positivas e negativas. Como ferramenta farmacológica, altas concentrações desse íon no líquido extracelular (solução de KCl 75 mM) levam à inativação desses canais, já que estes não atuam contra o gradiente de concentração. O acúmulo de íons  $K^+$  no interior da célula muscular leva à despolarização e consequente abertura de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem (NELSON & QUAYLE, 1995). O aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  tem como resultado a contração da fibra muscular. Essa contração independe da ativação de receptores. Diante desses pressupostos e dos resultados obtidos com a contração em presença de KCl 75mM, sugerimos que haja participação dos canais de  $K^+$  no efeito do Terpy sobre o músculo liso traqueal, já que houve redução do seu efeito máximo. O mesmo não ocorreu para o NPS, indicando que os canais de  $K^+$  tem menor participação no relaxamento promovido por este fármaco.

A ativação dos canais de  $K^+$  leva à retirada de  $K^+$  do interior das células e consequente hiperpolarização da membrana do músculo liso. Esse mecanismo de ativação dos canais de  $K^+$  é induzido pelo NO e pode ocorrer independente da ação dos nucleotídeos cíclicos, como o GMPc (BOLOTINA et al., 1994; PLANE et al., 1996; MISTRY & GARLAND, 1998; HOMER & WANSTALL, 2000). O estudo com o TEA (bloqueador não seletivo de canais de  $K^+$ ) levou à redução da eficácia do relaxamento induzido pelo Terpy, indicando novamente que os canais de  $K^+$  tem

importante participação no mecanismo de ação desse doador de NO em músculo liso traqueal. Estes resultados corroboram com os dados apresentados nos experimentos realizados com KCl 75 mM. Nós observamos aqui que a ativação dos canais de  $K^+$  independe de GMPc, uma vez que o ODQ, inibidor da GCs, não modificou o perfil de relaxamento do Terpy. A participação dos canais de  $K^+$  também foi verificada em músculo liso vascular, onde o TEA reduz a potência do Terpy (BONAVENTURA et al., 2007). Outros estudos apontam que em traquéias de cobaias e de bovinos, o TEA reduziu o relaxamento induzido por várias substâncias com propriedades relaxantes que usam a via GCs/GMPc (NAKAHARA et al., 2000; WU et al., 2004; LIN et al., 2006).

Já para o NPS, os resultados com TEA apresentaram-se inesperados, pois houve aumento tanto da eficácia quanto da potência dessa droga na presença do bloqueador. Sugerimos que esse efeito possa ser atribuído ao fato de que, além de bloquear canais de  $K^+$ , o TEA esteja promovendo outros efeitos celulares como discutido adiante.

Uma vez que dados da literatura apontam que os principais mecanismos envolvidos no relaxamento dos doadores de NO envolvem a via GCs/GMPc e os canais de  $K^+$ , avaliamos o efeito quando esses dois mecanismos estivessem conjuntamente inibidos por TEA e ODQ. Verificamos que a resposta ao relaxamento tanto do NPS quanto do Terpy na presença desses inibidores se deu pela redução tanto da eficácia quanto da potência. Estes resultados mais uma vez apontam para o não envolvimento da via GCs/GMPc no relaxamento induzido pelo Terpy, já que os resultados da associação TEA+ODQ foram muito próximos aos obtidos somente com o bloqueador dos canais de  $K^+$ , TEA.

A participação dos diferentes tipos de canais de  $K^+$  ( $K_{IR}$  - tipo retificador,  $K_{ATP}$  – dependentes de ATP intracelular,  $K_v$  - dependentes de voltagem,  $K_{Ca}$  - canais ativados por  $Ca^{2+}$  de baixa ( $SK_{Ca}$ ) e alta condutância ( $BK_{Ca}$ )) envolvidos no relaxamento do músculo liso traqueal também foi analisada pelo uso de bloqueadores seletivos. Os resultados mostraram que o relaxamento induzido pelo Terpy parece estar intimamente ligado à maioria desses canais, pois o bloqueio de diferentes canais de  $K^+$  por seus respectivos bloqueadores levou à redução do efeito máximo e da potência, diferentemente dos resultados encontrados com NPS.

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 (NELSON &

QUAYLE, 1995). Ainda, McCann et al. (1990), indicam que o canal  $K_{ir}$  tem importante participação no equilíbrio entre os íons  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  em células epiteliais do sistema respiratório. Esse canal é muito sensível ao  $BaCl_2$  (SCHUBERT et al., 2004) em tecidos de músculo liso intactos, e concentrações próximas de  $30 \mu M$ , o  $BaCl_2$  inibe seletivamente estes canais (QUAYLE et al., 1997; IMAI et al., 2001). Em nossos estudos, observamos que a presença desse inibidor reduziu o efeito máximo tanto do Terpy quanto do NPS, indicando a participação desse canal também no mecanismo de relaxamento do músculo liso traqueal. Entretanto, parece ser mais importante para o mecanismo do Terpy já que a sua potência também foi reduzida quando o canal  $K_{ir}$  foi bloqueado pelo  $BaCl_2$ . Resultados semelhantes foram encontrados para traquéias isoladas de bovinos, em que o  $BaCl_2$  reduziu o relaxamento induzido pela procainamida (NAKAHARA et al., 2000).

Os canais  $K_{ATP}$  são caracterizados pela sua sensibilidade ao estado metabólico da célula, sendo identificados e nomeados por serem sensivelmente dependentes de ATP intracelular. Em condições fisiológicas, a ativação desses canais tem pouca ou nenhuma dependência da voltagem e a concentração de ATP citoplasmático pode modulá-lo de forma que os canais  $K_{ATP}$  estão fechados e são abertos quando a razão ATP/ADP está diminuída (FOZARD & MANLEY, 2001). Quando abertos, promovem o efluxo de  $K^+$ , hiperpolarização da membrana e conseqüente fechamento dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. O bloqueio desse canal é atribuído às sulfaniluréias como a glibenclamida (NELSON & QUAYLE, 1995; FOZARD & MANLEY, 2001).

Em presença de glibenclamida, os resultados encontrados para o NPS não apresentaram variação de eficácia e potência, indicando que esses canais não participam do mecanismo de relaxamento celular do NPS. Já para o Terpy, a presença desse bloqueador levou à redução desses dois parâmetros. Esses resultados apontam para uma direta participação desses canais no relaxamento induzido pelo Terpy e também são similares os achados de Bonaventura et al. (2006), indicando a participação desses canais no relaxamento promovido por um doador de NO no músculo liso vascular. Estudos tem demonstrado que os canais  $K_{ATP}$  tem participação no efeito relaxante de traquéias de cobaias, pois a glibenclamida reduziu o efeito relaxante de várias substâncias dilatadoras como um protótipo derivado de xantina (WU et al., 2004, LIN et al., 2006), um derivado

flavonóide isokaempferida (LEAL et al., 2006) e do levosimedan (EKSERT & USTA, 2009).

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. Esses canais podem ser inibidos seletivamente pelo 4-AP (STANDEN & QUAYLE, 1998). O efeito máximo e a potência do Terpy no músculo liso traqueal foram reduzidos na presença do 4-AP, indicando que este canal tem um papel importante no mecanismo de relaxamento do doador em questão. Esses dados corroboram com os estudos de Bonaventura et al. (2006), onde em artéria de rato, esse bloqueador levou à redução do relaxamento promovido por um nitrosil-complexo de rutênio e estudos de Lin et al. (2006), em traquéia de cobaia, onde 4-AP reduziu o relaxamento provocado por um composto derivado de xantina. Entretanto, estudos tem sugerido que o inibidor dos canais  $K_v$  não modifica o efeito relaxante de um outro composto derivado de xantina e da levosimendan em traquéias de cobaias (WU et al., 2004; EKSERT & USTA 2009). Estes diferentes estudos apontam o importante papel dos  $K_v$  em músculo liso vascular e não vascular.

A participação dos canais de  $K^+$  no efeito relaxante do NPS foi inesperada já que houve aumento tanto da potência quanto da eficácia dessa droga na presença dos bloqueadores TEA (não seletivo) e 4-AP (seletivo para canais  $K_v$ ). Essas drogas, além de bloquearem canais de  $K^+$ , tem a capacidade de ativar diretamente as junções Gap em diferentes tecidos incluindo traquéias (KANNAN & DANIEL, 1978; WATTS et al., 1994). De acordo com Kannan & Daniel (1978), o tratamento tanto com o TEA quanto com o 4-AP em traquéia de cães tem a propriedade de aumentar o espaço juncional entre membranas de células musculares lisas, elevando o tamanho das junções Gap, que passam de 0,05% da área total de membrana para 0,09%.

As junções Gap são canais constituídos de dois hemicanais justapostos de matrizes hexaméricas formados por proteínas integrais de membrana conhecida como conexinas. No músculo liso vascular, as conexinas facilitam a comunicação química e elétrica entre o endotélio e o músculo liso, e entre as células adjacentes, ligando diretamente a região citoplasmática de duas células vizinhas. Metabólitos, íons, segundos mensageiros,  $Ca^{2+}$  entre outras moléculas  $\leq 1kDa$  são capazes de passar através das junções Gap de uma célula para outra (KUMAR & GILULA, 1996;

LAMPE & LAU, 2004), dessa forma, habilitando a produção coordenada de múltiplas respostas celulares.

Hoffmann et al. (2003), apresentaram em seu estudo em culturas de células endoteliais que o NO é um potente modulador das junções Gap por modificar diretamente a expressão de isoformas de conexina devido à ativação de proteína quinase A (PKA) e que o próprio NO pode atuar sobre as junções Gap. Patel et al. (2006), e Gönczi et al. (2009), sugerem que o NO aumenta a permeabilidade dessas junções em tecido cardíaco de ratos através da cascata GCs/GMPc/PKG. As PK, A, G ou ambas, são responsáveis por fosforilar conexinas e influenciar o acoplamento entre as Gaps. Diante dessas evidências, sugerimos que os mecanismos descritos anteriormente podem estar ocorrendo também em músculo liso traqueal de rato, facilitando a passagem do NO ou dos segundos mensageiros por ele gerados para as camadas de células mais profundas, promovendo a abertura das junções Gap. Portanto, aumentam o efeito do NO na presença de TEA e 4-AP, que comprovadamente aumentam a atividade dessas junções intercelulares. Essa resposta ocorreu apenas para o NPS porque a via GCs/GMPc/PKG parece ser ativada somente por este doador de NO, e não pelo Terpy, como evidenciado pelos outros resultados funcionais discutidos anteriormente. Com o aumento do GMPc e ativação da PKG promovidos pelo NPS, poderia haver maior acoplamento entre as junções Gaps, associado ao efeito do TEA e 4-AP, produzindo uma resposta mais coordenada e sincrônica sobre as células musculares lisas, potencializando assim o relaxamento. Apesar de acharmos esta explicação razoável, mais experimentos necessitam ser feitos para avaliar com mais precisão a influência do TEA e 4-A sobre o relaxamento induzido pelo NPS.

O cálcio intracelular tem um papel fundamental na regulação eletromecânica do músculo liso e a concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  pode modular outros canais iônicos, dentre eles, os canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ). Os  $\text{K}_{\text{Ca}}$  respondem a alterações da concentração de cálcio intracelular regulando o potencial de membrana e podem aumentar sua atividade com a despolarização desta (NELSON & QUAYLE, 1995). Um importante alvo para o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser os canais para  $\text{K}_{\text{Ca}}$  de baixa condutância (SK).  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  possuem propriedades dependentes do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (STANDEN & QUAYLE, 1998; IMAI et al., 2001). No presente trabalho, o bloqueio desse canal com apamina (bloqueador seletivo de  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) levou à redução do relaxamento do NPS. Esse resultado aponta

para a participação desse canal no efeito do NPS em músculo liso traqueal de ratos. Resultados semelhantes foram encontrados por Wu et al. (2004), em que um derivado de xantina leva ao relaxamento do músculo liso de traquéia de cobaia por ativar de canais de  $K^+$ , inclusive  $SK_{Ca}$ .

A apamina não alterou o relaxamento induzido pelo Terpy, indicando que o canal  $SK_{Ca}$  parece não participar do efeito dessa droga em músculo liso traqueal. Resultados semelhantes foram observados para outros doadores de NO em traquéias de cobaias (ALLEN et al., 1986) e para drogas dilatadoras em traquéias de bovinos (NAKAHARA et al., 2000, 2001).

Outro  $K_{Ca}$  importante na regulação do potencial de membrana é o canal de  $K^+$  ativado por  $Ca^{2+}$  de alta condutância ( $BK_{Ca}$ ). Este é estruturalmente distinto do  $SK_{Ca}$ , é bloqueado seletivamente pela iberitoxina e fisiologicamente, atua na fase de repolarização do potencial de ação (STANDEN & QUAYLE, 1998; IMAI et al., 2001). Alguns trabalhos tem demonstrado a importância desse canal no mecanismo de relaxamento de traquéia (COROMPT et al., 1998; NAKAHARA et al., 2000, 2001; LEAL et al., 2006). Entretanto, nossos resultados demonstraram que esse canal não participa do efeito relaxante de ambos doadores de NO (NPS e Terpy) em músculo liso de traquéias de ratos. Esse resultado corrobora com os achados de Li et al. (1997), em que o canal  $BK_{Ca}$  parece não ter participação no efeito relaxante de doadores de NO em músculo liso traqueal de camundongos.

Para o processo fisiológico de contração muscular, as fontes de  $Ca^{2+}$  podem ser de origem intracelular, extracelular ou ambas. Dessa forma, os íons  $Ca^{2+}$  são encontrados em quatro diferentes estoques: extracelular, citoplasmático, mitocondrial e no retículo sarcoplasmático (RS). O influxo de  $Ca^{2+}$  ocorre através de canais dependentes de voltagem (WORLEY & KOTLIKOFF, 1990) e por canais ligados a receptores (MURRAY & KOTLIKOFF, 1991; ITO et al., 1995) e é controlado por canais de  $Ca^{2+}$  regulados por estoque em resposta a depleção de  $Ca^{2+}$  do RS na tentativa de restabelecer a  $[Ca^{2+}]_i$  (AY et al., 2004; PABELICK et al., 2004; LEUNG et al., 2008).

Em músculo liso das vias aéreas, o influxo de  $Ca^{2+}$  é extremamente importante para o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular durante a contração e pode ser estimulado por agonistas muscarínicos (WORLEY & KOTLIKOFF, 1990; MURRAY & KOTLIKOFF, 1991). O NO pode levar à inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  pela membrana plasmática por diferentes mecanismos: através de mecanismos

dependentes de GMPc (ROBERTSON et al., 1993; BLATTER & WIER, 1994; AY et al., 2006) ou por hiperpolarização da membrana, através de mecanismos independentes de GMPc como ativação de canais de  $K^+$  (BOLOTINA, et al., 1994; TOQUE et al., 2010).

Nossos experimentos também revelaram que os doadores provocaram uma importante inibição da contração das preparações causada pelo  $Ca^{2+}$  extracelular, já que tanto o NPS quanto o Terpy inibiram a contração desencadeada pelo influxo de  $Ca^{2+}$  estimulado tanto pelo agonista contrátil quanto pela despolarização de membrana com KCl. Os resultados encontrados em presença de carbacol indicam que a inibição da contração causada pelo influxo de  $Ca^{2+}$  pode contribuir para o efeito relaxante desses doadores e que o Terpy foi mais efetivo em inibir essa contração. Os resultados encontrados na presença de altas concentrações de KCl (solução a 75 mM) indicam que tanto o NPS quanto o Terpy podem levar ao bloqueio dos canais de  $Ca^{2+}$  do tipo dependentes de voltagem, já que concentrações elevadas de  $K^+$  no líquido extracelular levam à abertura desse tipo de canal de  $Ca^{2+}$ . Baseados nesses resultados, sugerimos que ambos doadores de NO podem levar ao relaxamento o músculo liso traqueal possivelmente por alterar a mobilização ou sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  extracelular, mas que o Terpy parece ser mais efetivo quando a estimulação ocorre pelo carbacol. Porém, não podemos aqui indicar se ocorre realmente inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  e se esta inibição desencadeada pelos doadores de NO se dá de forma direta ou indireta. Esta é apenas uma hipótese provável, uma vez que os experimentos mostraram que a contração mediada pelo  $Ca^{2+}$  extracelular foi inibida pelos doadores.

O RS e a mitocôndria são considerados os principais estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$ . A  $[Ca^{2+}]_i$  é o que determina o tônus do músculo liso traqueal (JANSSEN et al., 2001; PABELICK et al., 2001; SANDERS, 2001; AY et al., 2006). Diversos estudos demonstraram que o armazenamento de  $Ca^{2+}$  pela bomba  $Ca^{2+}$ -ATPase reticular (que pode ser inibida pela taspigargina) está envolvido no relaxamento do músculo liso pelo NO (SIMS et al., 1996; KANNAN et al., 1997; BAZÁN-PERKINS et al., 2009). No presente estudo, a taspigargina não alterou a resposta relaxante para o NPS ou para o Terpy, sugerindo que o efeito desses compostos não é dependente da bomba  $Ca^{2+}$ -ATPase reticular. Esses achados corroboram com estudos que indicam que o armazenamento de  $Ca^{2+}$  por essa

bomba parece não estar envolvido na redução da  $[Ca^{2+}]_i$  em músculo liso das vias aéreas (ROUX & MARHL, 2004).

Além do RS, a mitocôndria também participa do tamponamento do  $Ca^{2+}$  intracelular (THOMAS et al., 1996). Os estudos de Roux & Marhl, 2004, apontam para a importância da captação de  $Ca^{2+}$  realizada pela mitocôndria, levando à redução da  $[Ca^{2+}]_i$  em células musculares lisas de traquéias de ratos. Na tentativa de explorar esta via de relaxamento, utilizamos o ruthenium red, inibidor do uniporter  $Ca^{2+}$  mitocondrial (KOSTERIN et al., 1996). Entretanto, nossos resultados mostram que a presença desse inibidor não alterou o perfil de relaxamento tanto do NPS quanto do Terpy. Estes resultados mostram que o tamponamento do  $Ca^{2+}$  intracelular realizado pela mitocôndria e inibido pelo ruthenium red não é importante para o relaxamento das traquéias induzido pelos doadores de NO utilizados neste estudo.

O epitélio ciliar é uma camada de células capaz de produzir mediadores que atuam no músculo liso tais como NO, prostaglandina  $E_2$ , fator de relaxamento derivado do epitélio, dentre outros. (NIJKAMP et al., 1993; FOLKERTS & NIJKAMP, 1998). A integridade do epitélio parece influenciar diretamente a manutenção do relaxamento do músculo liso traqueal de cobaias (TSCHIRHART et al., 1987; WU et al., 2004; LIN et al., 2006; COELHO et al., 2008) e bovinos (SPICUZZA et al., 2002).

O principal mecanismo de liberação de NO pelo NPS em sistemas biológicos é enzimático (HARRISON & BATES, 1993) e parece necessitar de NADP ou NADPH como cofator (BATES et al., 1991; KOWALUK et al., 1992). Para os complexos de rutênio, esse mecanismo não é requerido, pois a liberação de NO ocorre através de redução química ou eletroquímica (TOLEDO et al., 2002; SAUAIA et al., 2005). Nesse contexto, Bonaventura et al. (2008), verificaram que o relaxamento induzido pelo NPS em artéria de ratos é potencializado pela presença do endotélio vascular. A modulação desse relaxamento se dá pela ativação de sistemas enzimáticos constitutivos do endotélio, particularmente NO-sintase, culminando na produção de NO endógeno (BONAVENTURA et al., 2008) que somado ao NO exógeno potencializa o relaxamento. O epitélio das vias aéreas de humanos expressa NO-sintase endotelial (SHAUL et al., 1994) e a indução desta produz NO *in vivo* (GUO et al., 1995). Assim, nesse estudo, avaliamos a modulação do epitélio sobre a resposta relaxante dos doadores de NO, NPS e Terpy, em traquéia isolada de rato. Nossos resultados confirmaram que o epitélio está

envolvido no relaxamento induzido pelo NPS, porque a remoção deste levou a redução da resposta máxima induzida por este doador, semelhantemente ao observado em leito vascular (BONAVENTURA et al., 2008). Entretanto, o relaxamento induzido pelo Terpy não sofreu modificação com a remoção do epitélio. Uma possível explicação para isso é o fato de que o Terpy não necessita ser metabolizado para liberar NO (TOLEDO et al., 2002; SAUAIA et al., 2005).

Os agonistas  $\beta$ -adrenérgicos como salbutamol e terbutalina são conhecidamente utilizados como broncodilatadores devido a sua potência e eficácia terapêutica. A ligação nos receptores  $\beta$  por esses agonistas ativa adenilato ciclase, que por sua vez, eleva os níveis intracelulares de AMPc. Como consequência, há relaxamento do músculo liso.

Estudos têm demonstrado que a associação de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos com um doador de NO pode ser benéfico e potencializar o relaxamento do músculo liso de traquéias de cobaias (VAALI et al., 2000) e de aortas de ratos (CHAN et al., 2009) por apresentarem efeito sinérgico. Neste contexto, nós avaliamos a hipótese de que os doadores de NO testados, NPS e Terpy, poderiam apresentar efeito sinérgico com um agonista  $\beta$ -adrenérgico. Nossos resultados mostraram que em músculo liso de traquéia de ratos, o efeito sinérgico entre terbutalina (agonista  $\beta_2$ -adrenérgico) e NPS ou Terpy (doadores de NO) parece não ocorrer. Portanto, essa associação não parece ser interessante, uma vez que não houve resposta sinérgica, ao menos para os protocolos experimentais desenvolvidos no presente trabalho. Mais estudos devem ser realizados para analisar a viabilidade desta interação em traquéias isoladas de ratos.

A sonda Fluo 3-AM, utilizada na microscopia confocal, é permeável à membrana celular e no interior da célula é hidrolisada por esterases citosólicas a Fluo 3. Em pH fisiológico, o Fluo 3 não é fluorescente, entretanto, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  há formação de um produto capaz de emitir fluorescência, podendo então ser utilizado para medidas semi-quantitativas desse cátion no interior celular. Utilizando microscopia confocal demonstrou-se uma redução da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta ao Terpy maior que ao NPS. Esse resultado corrobora com os estudos de reatividade traqueal apresentados na figura 5. A maior eficácia do Terpy em levar ao relaxamento o músculo liso traqueal de ratos pode se dar pela alteração do transiente citoplasmático de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Diante dos resultados apresentados nesse trabalho, sugerimos que o Terpy é um protótipo de fármaco bastante promissor. Ele apresenta vantagem em relação ao NPS porque demonstrou maior eficácia no relaxamento do músculo liso traqueal. Isso indica que a aplicação terapêutica para doenças pulmonares obstrutivas pode ser possível futuramente. Entretanto, para confirmar esses pressupostos, mais estudos se tornam necessários, dentre eles, estudo do mecanismo de ação *in vitro* em traquéias de ratos asmáticos, estudos *in vivo* tanto em animais normais como em asmáticos.

Nossas perspectivas em relação a este trabalho se moldam no sentido de detalhar a participação das diferentes fosfodiesterases que podem atuar na degradação do GMPc, estudar a participação das junções Gap no relaxamento de doadores e NO no trato respiratório, verificar como se dá a atuação do NPS e do Terpy sobre os canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem, além de estudar o mecanismo de ação dessas mesmos compostos em animais asmáticos e ainda o desenvolvimento de uma forma farmacêutica para utilização intranasal.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que há algumas diferenças nas respostas relaxantes em traquéias de ratos quando estimuladas com o novo doador de NO, Terpy, ou com o fármaco padrão, NPS.

Os estudos funcionais revelaram que:

- Tanto o NPS quanto o Terpy induziram relaxamento de forma concentração-dependente.
- As traquéias de ratos apresentaram maior resposta relaxante para o Terpy do que para o NPS, mostrando que o novo doador é mais eficaz que o NPS.
- Os subprodutos do ácido araquidônico produzidos via COX e a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase reticular e pelo uniporter mitocondrial parecem não influenciar o relaxamento estimulado pelo NPS ou pelo Terpy.
- O mecanismo de ação provável do Terpy que leva ao relaxamento do músculo liso de traquéia dependem diretamente dos canais de  $\text{K}^+$  do tipo  $\text{K}_v$ ,  $\text{K}_{IR}$  e  $\text{K}_{ATP}$ .
- Diferente do observado para o NPS, a via NO/GCs/GMPc parece não participar do relaxamento induzido pelo Terpy.
- O NPS e o Terpy alteram a contração mediada pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado por carbacol ou KCl.
- O epitélio interfere no mecanismo de relaxamento apenas do NPS.
- O Terpy é mais eficaz em alterar o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular no músculo liso traqueal.
- Em músculo liso traqueal de ratos não ocorre sinergismo entre agonista  $\beta$ -adrenérgico – terbutalina – e doadores de NO.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.** 357, 593–615, 2001.
- ALLEN, S.L.; FOSTER, R.W.; MORGAN, G.P et al. The relaxant action of nicorandil in guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmac.** 87, 117-127, 1986.
- ARNOLD, W.P.; LONGNECKER, D.E.; EPSTEIN, R.M. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. **Anesthesiology.** 61(3), 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.** 74(8), 3203-3207, 1977.
- ASHUTOSH, K.; PHADKE, K.; JACKSON, J.F.; et al. Use of nitric oxide inhalation in chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax.** 55, 109-113, 2000.
- AY, B.; BINNAZ, A.Y.; IYANOYE, A.; et al. Cyclic nucleotide regulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx in airway smooth muscle. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 290, L278–L283, 2006.
- AY, B.; PRAKASH, Y.S.; PABELICK, C.M.; et al. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in porcine airway smooth muscle. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 286, L909–L917, 2004.
- BALZARY, R.W. & COCKS, T.M. Lipopolysaccharide Induces Epithelium- and Prostaglandin E<sub>2</sub>-Dependent Relaxation of Mouse Isolated Trachea through Activation of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 317, 806–812, 2006
- BARNES, P.J, & BELVISI, M.G. Nitric oxide and lung disease. **Thorax** 48, 1034–1043, 1993.
- BARNES, P.J. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases and airway function. **Eur. Respir. J.** 8, 457-462, 1995.
- 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.** 11, S157-165, 1991.
- BAZÁN-PERKINS, B.; SÁNCHEZ-GUERRERO, E.; CAMPOS, M.G. Capacitative Ca<sup>2+</sup> entry during Ca<sup>2+</sup> undershoot in bovine airway smooth muscle. **Cell Physiol. Biochem.** 24(3-4), 161-166, 2009.
- BERNAREGGI, M.M.; BELVISI, M.G.; PATEL, H.; et al. Anti-spasmogenic activity of isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors in guinea-pig trachealis. **Br. J. Pharmacol.** 128, 327-336, 1999.
- BLATTER, L.A. & WIER, W.G. Nitric oxide decreases [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. **Cell Calcium** 15(2),122-131,1994.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature.** 368, 850-853, 1994.
- BONAVENTURA, C.; FAGO, A.; HENKENS, R.; CRUMBLISS, A.L. Critical redox and allosteric aspects of nitric oxide interactions with hemoglobin. **Antioxid Redox Signal.** 6(6), 979-991, 2004.
- 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.** 46(3), 215-222, 2007.
- BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J.; et al. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide** 18(4), 287-295, 2008.
- 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** 15(4), 387-94, 2006.
- BOULANGER, C.M. & VANHOUTTE, P.M. G proteins and endothelium-dependent relaxations. **J. Vasc. Res.** 34, 175-185, 1997.
- BOVE, P.F. & VAN DER VLIET, A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. **Free Radical Biology & Medicine** 41, 515–527, 2006.
- BUGA, G.M.; GOLD, M.E.; WOOD, K.S.; et al. Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle. **Euro. J. Pharmacol.** 161, 61–72,1989.
- CHAN, S.S.; JONES, R.L.; LIN, G. Synergistic interaction between the Ligusticum chuanxiong constituent butylidenephthalide and nitric oxide donor sodium nitroprusside in relaxing rat isolated aort. **Journal of Ethnopharmacology.** 122, 308-312, 2009.

- COELHO, L.P.; SERRA, M.F.; PIRES, A.L.A.; et al. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-GMP pathway. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 327, 206–214, 2008.
- COROMPT, E.; BESSARD, G.; LANTUEJOUL, S.; et al. Inhibitory effects of large Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channel blockers on  $\beta$ -adrenergic- and NO-donor-mediated relaxations of human and guinea-pig airway smooth muscles. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 357, 77–86, 1998.
- 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** 20, 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]<sup>3+</sup> complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation **Inorg. Chim. Acta** 359, 2543–2549, 2006.
- de LIMA, R.G.; SAUAIA, M.G.; BONAVENTURA, D.; et al. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorg. Chim. Acta.** 358, 2643–2650, 2005.
- 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.** 130(2), 433–446, 2010.
- 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.** 280, 1215–1218, 1997.
- ESTEVEZ, A.G.; RADÍ, R.; BARBEITO, L.; et al. Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. **J. Neurochem.** 65, 1543–1550, 1995.
- EKSERT, B. & USTA, C. Role of potassium channels in the relaxant effect of levosimendan in guinea pig tracheal preparations. **Farmacol. Rep.** 61, 275–280, 2009.
- FEELISCH, M. & KELM, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 180(1), 286–293, 1991.
- FLECKENSTEIN, A. & FLECKENSTEIN-GRÜN, G. Mechanism of action of calcium antagonist in heart and vascular smooth muscle. **Eur. Heart J.** 9, H95–99, 1988.
- FOLKERTS, G. & NIJKAMP, F.P. Airway epithelium: more than just a barrier! **Trends Pharmacol. Sci.** 19, 334–341, 1998.
- FOZARD, J.R. & MANLEY, P.W. Potassium channel openers. **Prog. Respir. Basel, Karger.** 31, 77–78, 2001.
- FURCHGOTT, R.F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Biosci. Rep.** 19(4), 235–251, 1999.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288, 373–376, 1980.
- GASTON, B.; DRAZEN, J.M.; JANSEN, A.; et al. Relaxation of human bronchial smooth muscle by S-nitrosothiols in vitro. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 268, 978–984, 1994.
- GÖNCZI, M.; PAPP, R.; KOVÁCS, M.; et al. Modulation of gap junctions by nitric oxide contributes to the anti-arrhythmic effect of sodium nitroprusside? **Brit. J. Pharmacol.** 156, 786–793, 2009.
- GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. **The nitrites.** In The pharmacological basis of therapeutics. Philadelphia: Lea & Febiger, 1941.
- 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** 92(17), 7809–7813, 1995.
- GUPTA, P.K.; SUBRAMANI, J.; LEO, M.D.; et al. Role of voltage-dependent potassium channels and myo-endothelial gap junctions in 4-aminopyridine-induced inhibition of acetylcholine relaxation in rat carotid artery. **Eur. J. Pharmacol.** 591, 171–176, 2008.
- HARRISON, D.G. & BATES, J.N. The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. **Circulation.** 87(5), 1461–1467, 1993.
- HASHIBA, E.; SATO, T.; HIROTA, K.; et al. The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity. **Anesth. Analg.** 89, 191–196, 1999.
- HJOBERG, J.; HÖGMAN, M.; HEDENSTIERNA, G. Hyperosmolarity reduces the relaxing potency of nitric oxide donors in guinea-pig trachea. **Br. J. Pharmacol.** 127, 391–396, 1999.
- HOFFMANN, A.; GLOE, T.; POHL, U.; et al. Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. **Card. Res.** 60, 421–430, 2003.

- HÖGMAN, M.; FROSTELL, C.G.; HEDENSTRÖM, H.; et al. Inhalation of nitric oxide modulates adult human bronchial tone. **Am. Rev. Respir. Dis.** 148, 1474-1478, 1993.
- 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.** 131, 673-682, 2000.
- HWANG, T-L.; WU, C-C.; TENG, C-M. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. **Br. J. Pharmacol.** 125, 1158-1163, 1998.
- HWANG, T-L.; WU, C-C.; TENG, C-M. YC-1 potentiates nitric oxide-induced relaxation in guinea-pig trachea. **Br. J. Pharmacol.** 128, 577-584, 1999.
- IGNARRO, L.J.; BARRY, B.K.; GRUETTER, D.Y.; et al. Guanylate cyclase activation of nitroprusside and nitrosoguanidine is related to formation of S-nitrosothiol intermediates. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 94(1), 93-100, 1980.
- IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.** 41(4), 485-490, 1991.
- IMAI, T.; OKAMOTO, T.; YAMAMOTO, Y. et al. Effects of different types of K<sup>+</sup> channel modulators on the spontaneous myogenic contraction of guinea-pig urinary bladder smooth muscle. **Acta Physiol. Scand.** 173, 323-333, 2001.
- ITO, Y.; TAKAGI, K.; TOMITA, T. Relaxant actions of isoprenaline on guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.** 116, 2738-2742, 1995.
- JANSSEN, L.J.; WATTIE, J.; LU-CHAO, H.; et al. Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. **J. Appl. Physiol.** 91, 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-morpholininosydnonimine. **Am. J. Physiol.** 266, L9-16, 1994.
- 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.** 153(1), 128-135, 1996.
- KANAGY, N.L.; CHARPIE, J.R.; DANANBERG, J.; et al. Decreased sensitivity to vasoconstrictors in aortic rings after acute exposure to nitric oxide. **Am. J. Physiol.** 271, H253-260, 1996.
- KANNAN, M.S. & DANIEL, E.E. Formation of gap junctions by treatment in vitro with potassium conductance blockers. **J. Cell Biol.** 78, 338-348, 1978.
- KANNAN, M.S.; PRAKASH, Y.S.; JOHNSON, D.E.; et al. Nitric oxide inhibits calcium release from sarcoplasmic reticulum of porcine tracheal smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.** 272, L1-7, 1997.
- KARAKI, H.; SATO, K.; OZAKI, H.; et al. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.** 156(2), 259-266, 1988.
- KHARITONOV, S.A. Influence of different therapeutic strategies on exhaled NO and lung inflammation in asthma and COPD. **Vascul. Pharmacol.** 43, 371 - 378, 2005.
- KOJIMA, H.; SAKURAI, K.; KIKUCHI, K.; et al. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. **Chem. Pharm. Bull** 46, 373-375, 1998.
- KOSTERIN, S.A.; BRATKOVA, N.F.; BABICH, L.G.; et al. Effect of inhibitors of energy-dependent Ca<sup>2+</sup>-transporting systems on calcium pumps of a smooth muscle cell. **Ukr Biokhim Zh.** 68(6), 50-61, 1996.
- KOWALUK, E.A & FUNG, H.L. Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 255(3), 1256-1264, 1990.
- KUMAR, N.M. & GILULA, N.B. The gap junction communication channel. **Cell.** 84(3), 381-388, 1996.
- KWAK, Y.L.; JONES, K.A.; WARNER, D.O.; et al. NO responsiveness in pulmonary artery and airway smooth muscle: the role of cGMP regulation. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 290, L200-L208, 2006.
- LAMARQUE, D. & WHITTLE, B.J. Role of oxygen-derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors. **Eur. J. Pharmacol.** 277, 187-194, 1995.
- LAMPE, P.D. & LAU, A.F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 36(7), 1171-1186, 2004.

- LARSEN, G.L.; LOADER, J.; FRATELLI, C. et al. Modulation of airway responses by prostaglandins in young and fully grown rabbits. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 293, L239–L244, 2007.
- LEAL, L.K.A.M.; COSTA, M.F.; PITOMBEIRA, M.; et al. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences.** 79, 98–104, 2006.
- LEUNG, F.P.; YUNG, L.M.; YAO, X.; et al. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.** 153, 846–857, 2008.
- LI, L.; VAALI, K.; PAAKKARI, I.; et al. Bradykinin, lemakalim and sodium nitroprusside relax the mouse trachea in vitro by different mechanisms. **Pharmacology letters.** 61,(7), 67–73, 1997.
- 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- $\alpha$ -induced tracheal contraction, involving nitric oxide release and expression of cgmp and protein kinase g. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 316, 709–717, 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<sub>6</sub>) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. **Vascul. Pharmacol.** 47(2-3), 139–144, 2007.
- MANG, C.F. & KILBINGER H. Modulation of acetylcholine release in the guinea-pig trachea by the nitric oxide donor, S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP). **Br. J. Pharmacol.** 131, 94–98, 2000.
- 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.** 48(2), 83–87, 1998.
- MCCANN, J.D.; MATSUDA, J.; GARCIA, M.; et al. Basolateral K<sup>+</sup> channels in airway epithelia. I. Regulation by Ca<sup>2+</sup> and block by charybdotoxin. **Am. J. Physiol.** 258, L334–342, 1990.
- MCDANIEL, N.L.; CHEN, X.L.; SINGER, H.A., et al. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and uncoupling stress from myosin phosphorylation. **Am. J. Physiol.** 263, C461–C467, 1992.
- MCINTYRE, M.; BOHR, D.F.; DOMINICZAK, A.F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. **Hypertension.** 34, 539–45, 1999.
- MIYOSHI, H.; NAKAYA, Y.; MORITOKI, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of vascular smooth muscle cells. **Febs Letters.** 345(1), 47–49, 1994.
- MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J. Clin. Invest.** 78(1), 1–5, 1986.
- MURRAY, R.K. & KOTLIKOFF, M.I. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. **J. Physiol.** 435, 123–144, 1991.
- MISTRY, D.K. & GARLAND, C.J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel (BKCa) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.** 124, 1131–1140, 1998.
- NAKAHARA, T.; MORIUCHI, H.; TANAKA, Y.; et al. Role of K<sub>v</sub> channels in N-acetylprocainamide-induced relaxation of bovine tracheal smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.** 415, 73–78, 2001.
- NAKAHARA, T.; MORIUCHI, H.; YUNOKI, M.; et al. Involvement of K<sup>+</sup> channel in procainamide-induced relaxation of bovine tracheal smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.** 402, 143–149, 2000.
- NAPOLI, C.; SICA, V.; DE NIGRIS, F.; et al. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. **Am. Heart. J.** 148(1), e5, 2004.
- NELSON, M.T. & QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.** 268, C799–C822, 1995.
- NIJKAMP, F.P. & FOLKERTS, G. Nitric oxide and bronchial hyperresponsiveness. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 329(1), 81–96, 1995.
- NIJKAMP, F.P.; VAN DER LINDE, H.J.; FOLKERTS, G. Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway responsiveness in the guinea pig in vivo and in vitro: role of the epithelium. **Am. Rev. Respir. Dis.** 148, 727–734, 1993.
- 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.** 90, 2092–2096, 1992.

- PABELICK, C.M.; AY, B.; PRAKASH, Y.S.; et al. Effects of volatile anesthetics on store-operated Ca<sup>2+</sup> influx in airway smooth muscle. **Anesthesiology** 101, 373–380, 2004.
- PABELICK, C.M.; SIECK, G.C.; PRAKASH, Y.S. Invited review: significance of spatial and temporal heterogeneity of calcium transients in smooth muscle. **J. Appl. Physiol.** 91, 488–496, 2001.
- 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.** 13, 41–54, 2006.
- PFEFFER, K.D.; ELLISON, G.; ROBERTSON, D.; et al. The effect of inhaled nitric oxide in pediatric asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 153(2), 747-751, 1996.
- PERKINS, W.J.; PABELICK, C.; WARNER, D.O.; et al. cGMP-independent mechanism of airway smooth muscle relaxation induced by S-nitrosoglutathione. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 275, 468-474, 1998.
- 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.** 123, 1557–1562, 1996.
- QUAYLE, J.M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiol. Rev.** 77, 1165-1232, 1997.
- RABE, K.F.; MAGNUSSEN, H.; DENT, G. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants. **Eur. Respir. J.** 8, 637-642, 1995.
- RADOMSKI, M.W.; REES, D.D.; DUTRA, A.; et al. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.** 107(3), 433-439, 1992.
- RAEBURN, D.; HAY, D.W.; FARMER, S.G.; FEDAN, J.S. Epithelium removal increases the reactivity of human isolated tracheal muscle to methacholine and reduces the effect of verapamil. **Eur. J. Pharmacol.** 123, 451–453, 1986.
- REDINGTON, A.E. Modulation of nitric oxide pathways: Therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Eur. J. Pharmacol.** 533, 263–276, 2006.
- 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.** 265, C299-303, 1993.
- ROCHA, L.M.; KIHARA, A.H.; DAVEL, A.P.; et al. Blood pressure variability increases connexin expression in the vascular smooth muscle of rats. **Cardiovasc Res.** 80(1), 123-130, 2008.
- ROTTA, J.C.; LUNARDI, C.N.; TEDESCO, A.C. Nitric oxide release from the S-nitrosothiol zinc phthalocyanine complex by flash photolysis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 36(5), 587-594, 2003.
- ROUX, E. & MARHL, M. Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in Ca<sup>2+</sup> removal in airway myocytes. **Biophys J.** 86(4), 2583-2595, 2004.
- SANDERS, K.M. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **J. Appl. Physiol.** 91, 1438–1449, 2001.
- SANNA, A.; KURTANSKY, A.; VERITER, C.; et al. Bronchodilator effect of inhaled nitric oxide in healthy men. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 150, 1702-1704, 1994.
- SAUAIA, M.G.; DE LIMA, R.G.; TEDESCO, A.C.; et al. Nitric oxide production by visible light irradiation of aqueous solution of nitrosyl ruthenium complexes. **Inorg Chem.** 44(26), 9946-9951, 2005.
- 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.** 125, 14718–14719, 2003.
- SCHAFER, A.I.; RODRIGUEZ, R.; LOSCALZO, J.; et al. Inhibition of vascular endothelial cell prostacyclin synthesis by plasmin. **Blood.** 74, 1015-1020, 1989.
- SCHUBERT, R.; KRIEN, U.; WULFSEN, I.; et al. Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arterioles by activation of inward rectifier potassium channels. **Hypertension** 43, 891-896, 2004.
- SCHAAFMA, D.; GOSENS, R.; RIS, J.M.; et al. Insulin induces airway smooth muscle contraction. **Br. J. Pharmacol.** 150, 136–142, 2007.
- SHAH, A. M. Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. **Cardiovasc. Res.** 31, 847-867, 1996.
- SHAUL, P.W.; WELLS, L.B.; HORNING, K.M. Acute and prolonged hypoxia attenuate endothelial nitric oxide production in rat pulmonary arteries by different mechanisms. **J Cardiovasc Pharmacol.** 22(6), 819-827, 1993.
- SIMS, S.M.; JIAO, Y.; ZHENG, Z.G. Intracellular calcium stores in isolated tracheal smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.** 271, L300-309, 1996.

- SPICUZZA, L.; BASILE, L.; BELVISI, M.G.; et al. The protective role of pithelium-derived nitric oxide in isolated bovine trachea. **Pul. Pharmacol. Ther.** 15, 357-362, 2002
- STANDEN, N.B. & QUAYLE, J.M.  $K^+$  channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiol. Scand.** 164, 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.** 77, 1142-1147, 1994.
- 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.** 18, 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.** 21(4), 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.** 10, 1505-1517, 1996.
- TOLEDO, J.C. JR.; LOPES, L.G.; ALVES, A.A.; et al. Release of NO by a nitrosyl complex upon activation by the mitochondrial reducing power. **J Inorg Biochem.** 89, 267-271, 2002.
- 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.** 645, 158-164, 2010.
- TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; et al. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 243, 310-316, 1987.
- TURNER, N.C.; LAMB, J.; WORBY, A.; et al. Relaxation of guinea-pig trachea by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and their enhancement by sodium nitroprusside. **Br. J. Pharmacol.** 111, 1047-1052, 1994.
- VAALI, K.; LI, L.; LÄHTEENMÄKI, T.; et al. Role of  $BK_{Ca}$  channels and cyclic nucleotides in synergistic relaxation of trachea. **Eur. J. Pharmacol.** 399, 75-84, 2000.
- 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.** 91, 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.** 58, 289-293, 2003.
- WANG, Y.X.; LEGZDINS, P.; POON, J.S.; et al. Vasodilator effects of organotransition-metal nitrosyl complexes, novel nitric oxide donors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 35, 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.** 31, 307-313, 1994.
- WOODMAN, O.L. & BOUJAOUDE, M. Chronic treatment of male rats with daidzein and 17 beta-oestradiol induces the contribution of EDHF to endothelium-dependent relaxation. **Br. J. Pharmacol.** 141(2), 322-328, 2004.
- WORKS, C.F.; JOCHER, C.J.; BART, G.D.; et al. Photochemical nitric oxide precursors: synthesis, photochemistry, and ligand substitution kinetics of ruthenium salen nitrosyl and ruthenium salophen nitrosyl complexes. **Inorg. Chem.** 41(14), 3728-3739, 2002.
- WORLEY, J.F. & KOTLIKOFF, M.I. Dihydropyridine-sensitive single calcium channels in airway smooth muscle cells. **Am J Physiol.** 259, L468-480, 1990.
- 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.** 142, 1105-1114, 2004.
- YAKAZU, Y.; IWASAWA, K.; NARITA, H.; et al. Hemodynamic and sympathetic effects of fenoldopam and sodium nitroprusside. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 45, 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.** 258, 972-978, 1991.