

MARIA JULIA MARQUES

*Este exemplar
do candidato
Juliana*

*corresponde a redação final de tese defendida
por Maria Julia Marques e aprovada pela Comissão*

M. Ant. Pereira

02 Julho 1987

FISIOLOGIA DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL
DE COBAIAS "IN VITRO": EFEITOS DA
INDOMETACINA E DO AZUL DE METILENO.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do T
tulo de Mestre em Biologia, na
área de Fisiologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. URBANO M.F. MEIRELLES

CAMPINAS

- 1 9 8 7 -

UNICAMP

FISIOLOGIA DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL
DE COBAIAS "IN VITRO": EFEITOS DA
INDOMETACINA E DO AZUL DE METILENO.

Aos Meus Pais

Ao Humberto

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Urbano M.F. Meirelles, pela orientação firme e serena que dedicou durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Dias Fontana e à Prof^a Dr^a L^{ea} Rodrigues Simioni, a quem devemos parte de nossa iniciação científica.

À Companhia Rhodia S/A, na pessoa da Dr^a Ingrid Menz, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

As colegas Glauce, Sílvia e Lúcia, pelas sugestões e incentivos.

Aos Senhores José Ilton dos Santos e Miguel Borges da Silva, pela manutenção dos animais.

À Sr^a Silvia Helena Burghi Kalaf, pela atenção dispensada no serviço de datilografia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos nº 84/0894-7 e nº 84/1432-7), pelo auxílio financeiro.

INDICE

INTRODUÇÃO	2
I) Considerações Gerais sobre o Sistema Respiratório	2
II) Aspectos Fisiopatológicos da Asma Brônquica	3
III) Prostaglandinas: alguns aspectos da sua biossíntese.	4
IV) Estudo da Musculatura Lisa Traqueal	6
IVa) Respostas Contráteis da Traquéia	7
IVb) Respostas Relaxantes da Cadeia Traqueal	8
OBJETIVOS	14
MATERIAL E MÉTODOS	16
I) Material	16
1. Animais	16
2. Drogas	16
3. Solução Nutritiva	17
4. Aparelhagem	17
II) Métodos	18
1. Preparo das Soluções	18
2. Montagem da Cadeia Traqueal	21
3. Estimulação Mecânica da Preparação	22
4. Abreviações e termos empregados	23
RESULTADOS	26
I) Respostas Contráteis aos Estímulos Mecânicos	26
II) Respostas Contráteis ao Carbacol	29
III) Efeitos da Indometacina nas Respostas Contráteis ao CBC	32
IV) Respostas Relaxantes ao Nitroprussiato de Sódio	39

V) Efeitos do Azul de Metileno	44
V.1. Sobre as Respostas Contráteis ao Carbacol	44
V.2. Sobre o Relaxamento pelo NPR: pré-contracção pe lo CBC	47
V.3. Sobre as Respostas Contráteis aos Estímulos mecâ nicos	49
V.4. Sobre o Relaxamento pelo NPR das Contrações provo cadas por Estimulação Mecânica	53
VI) Efeitos da Indometacina nas Respostas ao NPR	55
DISCUSSÃO	58
I) Respostas Contráteis do Músculo Liso Traqueal	58
Ia) Efeitos da Indometacina	64
II) Respostas Relaxantes ao Nitroprussiato de Sódio	66
III) Respostas ao Azul de Metileno	71
CONCLUSÕES	77
SUMMARY	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

I N T R O D U Ç Ã O

I) CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO

A troca dos gases respiratórios, oxigênio e gás carbônico, entre o sangue e a atmosfera, é a base essencial dos processos da vida. Nos seres unicelulares, estes gases se difundem diretamente através da superfície da célula, estabelecem equilíbrio por gradientes parciais de pressão e mantêm o metabolismo destes organismos adequado à sua sobrevivência. Já nos metazoários, com organização tecidual mais complexa, fica impossível a simples difusão gasosa por distâncias corporais maiores; desenvolve-se então um sistema de transporte do ar até o interior do corpo animal, que termina em áreas especializadas para as trocas gasosas. Tome-se como exemplo o sistema traqueal dos artrópodos: nos tubos de anéis quitinosos, que impedem o colapamento do sistema, está a unidade estrutural que irá se repetir em todos os vertebrados. Nos mamíferos, o sistema respiratório é composto basicamente pelo nariz, cavidade nasal, naso e orofaringe, laringe, traquéia, brônquios, bronquíolos e pulmões. No entanto, a especialização em uma "árvore" traqueo-bronquial de tubos condutores, e o arranjo terminal em sacos alveolares delgados, onde ocorrem trocas gasosas, são evidentes já nos primeiros vertebrados terrestres (GRAY, 1979).

As principais alterações volumétricas da inspiração e expiração ocorrem nos alvéolos; entretanto, os tubos condutores também modificam seu calibre, por relaxamentos ou contrações da musculatura lisa das suas paredes. Isto mostra que o sistema traqueo-bronquial não tem um papel passivo no processo respiratório, podendo modificar o volume de ar que é transportado e, em condições anormais, mesmo dificultar ou impedir a passagem do ar até os pulmões. A regulação da musculatura da porção traqueo-bronquial, quer pelo sistema nervoso autônomo, quer por mediadores e moduladores intra-celulares, permite um ajuste fino da ventilação pulmonar, adaptando ou não o indivíduo às possíveis condições adversas do meio ambiente.

II) ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA ASMA BRÔNQUICA

A asma brônquica é caracterizada por obstrução das vias respiratórias em resposta a diferentes estímulos, tais como o exercício físico, o frio, diversos poluentes suspensos no ar, infecções e outros de origem indeterminada. Esta obstrução, causada basicamente por uma constrição exagerada da musculatura lisa do trato respiratório, é intensificada por um edema da mucosa bronquial e aumento da secreção do muco, que normalmente acompanham a reação (NADEL & BARNES, 1984). Tem sido sugerido que as alterações fisiopatológicas da asma são decorrentes da ação da histamina, prostaglandinas e leucotrienos, liberados de mastócitos bronquiais ativa

dos por um mecanismo dependente de imunoglobulina E (ROBINSON & HOLGATE, 1985). Concomitantemente, a hiper-reatividade observada nos indivíduos asmáticos seria devida a um desequilíbrio entre mecanismos broncoconstritores e broncodilatadores, havendo predominância de atividade alfa-adrenérgica (BARNES e cols., 1980). Também sugere-se que possa ocorrer diminuição da função do receptor beta devida à sua dessensibilização (OMINI e cols., 1985), à alterações da composição de fosfolipídeos da membrana (NATH e cols., 1983) ou ainda à infecções bacterianas do trato respiratório (ENGELS e cols., 1985).

Assim, há crescente interesse na compreensão dos mecanismos endógenos envolvidos na regulação das respostas contráteis da musculatura lisa respiratória, uma vez que participam da fisiopatologia da asma brônquica.

III) PROSTAGLANDINAS: ALGUNS ASPECTOS DA SUA BIOSSÍNTESE

As prostaglandinas, derivados de ácidos graxos essenciais com vinte átomos de carbono na molécula, têm despertado grande interesse para a pesquisa biológica, e vários são os motivos pelos quais elas se tornaram tão intensamente estudadas. Estas substâncias são sintetizadas por todos os tecidos do corpo, em resposta a diversos estímulos quer de natureza química ou física. Elas produzem efeitos em pequenas concentrações, numa amplitude que engloba, praticamente, todas as funções biológicas do organismo. A inibição da sua biossíntese é o mecanismo pelo qual agem drogas como a aspi

rina, um dos agentes anti-inflamatórios não esteróides mais utilizados na terapêutica (FLOWER, 1974; MONCADA, FLOWER & VANE, 1985). No homem, seu principal precursor é o ácido araquidônico, derivado do ácido linoleico da dieta, ou então, ingerido diretamente como constituinte dos alimentos. Grande parte do ácido araquidônico está esterificado como componente de fosfolípídeos das membranas celulares e, em menor quantidade nos triglicerídeos. Os níveis desse ácido graxo livre no citoplasma e no plasma é baixo, sendo que na maioria dos tecidos a síntese dos eicosanóides é limitada pela disponibilidade do ácido araquidônico liberado da membrana. A existência de diferentes estoques deste ácido graxo na célula confere uma heterogeneidade tecidual inter e intra-celular, o que dificulta o entendimento dos mecanismos envolvidos na sua liberação (IRVINE, 1982). De acordo com revisão feita por VAN DEN BOSCH (1980), a fosfolipase A₂ está intimamente associada à membrana celular, sendo a principal responsável pela retirada do ácido araquidônico dos fosfolípídeos. Vários fatores regulam a sua atividade, tais como, a necessidade absoluta de Ca⁺⁺ e modificações no arranjo dos fosfolípídeos que, alterando a estrutura da membrana, ativariam a enzima. Uma vez liberado, o ácido araquidônico é rapidamente metabolizado por diferentes sistemas enzimáticos; sob ação da ciclooxigenase originam-se as prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, enquanto que os leucotrienos resultam da ação de várias lipooxigenases. A biossíntese destes eicosanóides ocorre em resposta a estímulos físicos, químicos ou hormonais e a ativação das enzimas envolve aumentos dos ní

veis intracelulares do Ca^{++} (MONCADA, FLOWER & VANE, 1985).

IV) ESTUDOS DA MUSCULATURA LISA TRAQUEAL

Contrações ou relaxamentos do músculo respiratório são fáceis e prontamente observados quando anéis bronquiais ou traqueais são mantidos experimentalmente "in vitro", banhados com líquido nutritivo adequado, sendo registradas alterações no comprimento ou na tensão da musculatura (WIDDICOMBE, 1963). Neste sentido, a musculatura respiratória de cobaias é amplamente utilizada para se estabelecer relações entre a asma experimental e a asma bronquial humana, vista a semelhança da resposta asmática destes animais à do ser humano. KALLÓS & KALLÓS (1984), estabelecendo comparações entre a asma experimental na cobaia e a asma bronquial humana, observaram que as alterações histológicas dos pulmões e brônquios, assim como os sintomas clínicos de animais experimentalmente asmáticos, eram muito semelhantes às de seres humanos que haviam morrido em consequência de "status asmaticus". Verificou-se também que o mecanismo básico do processo, tanto no homem como na cobaia, é a formação da imunoglobulina E que, em contato com o antígeno, provoca a desgranulação dos mastócitos, com consequente broncoconstrição, vasodilatação e inflamação eosinofílica nos tecidos respiratórios em que ocorreu a reação antígeno-anticorpo.

IVa) RESPOSTAS CONTRÁTEIS DA TRAQUEIA

As pesquisas iniciais realizadas com o músculo liso traqueal "in vitro" ressaltaram o promissor emprego desta preparação como um tecido "teste" para a análise de drogas potencialmente simpaticomiméticas. Fazendo um estudo da potência relativa de vários agentes broncodilatadores, FOSTER (1966) classificou os receptores adrenérgicos da traqueia como sendo do tipo beta, não havendo evidências até então da presença de receptores alfa. Esta característica da musculatura traqueal favoreceu seu uso na análise de novas drogas broncodilatadoras. Entretanto, pesquisas subsequentes demonstraram a existência de potencialidades funcionais muito mais amplas, envolvendo reatividade a agentes colinérgicos e anti-colinérgicos (AHMED e cols., 1984), autacóides (DOUGLAS e cols., 1984; McCAIG, 1986), ionóforos (PARK & RASMUSSEN, 1985), antagonistas do cálcio (DUNCAN & DOUGLAS, 1984; BENGISSON e cols., 1985; DAMIANO & BARBIERI, 1985), mensageiros intracelulares (DUNCAN e cols., 1980; HASHIMOTO e cols., 1985) e receptores alfa-adrenérgicos (OHNO e cols., 1981; LEFF e cols., 1986).

Além disso, a produção endógena de prostaglandinas pelo músculo liso traqueal (FARMER e cols., 1972) provoca o aparecimento de uma resposta contrátil espontânea (COLEMAN & FARMER, 1971), cujo papel foi intensamente pesquisado nos estudos subsequentes das respostas contráteis e relaxantes desta musculatura. OREHEK e cols. (1975) sugeriram que prostaglandinas E_2 e F_2 - alfa modulavam a intensidade de

contração do músculo traqueal de cobaias a histamina, acetilcolina, serotonina, bário e potássio. A sensibilidade a histamina seria determinada por prostaglandinas e prostaciclina, tanto no músculo traqueal de cão (SHORE e cols., 1985), como no de porco (MITCHELL, 1982 e 1984), sendo seus efeitos mediados por aumentos dos níveis do AMP-cíclico (BRINK e cols., 1981; CREESE & DENBOROUGH, 1980). Os prostanóides também participariam na modulação da neurotransmissão colinérgica do músculo traqueal de cobaias, tanto pré-como pós-juncional (JONES e cols., 1980), e no mecanismo da taquifilaxia a histamina observado na traquéia do cão (ANDERSON e cols., 1979). Os leucotrienos têm papel importante na regulação endógena do músculo traqueal (ADCOCK & GARLAND, 1980), havendo evidências da presença de receptores para leucotrienos na traquéia de cobaias (SNYDER & KRELL, 1984). Provavelmente, os leucotrienos são os principais responsáveis pelo tono basal da traquéia humana, tal como verificado por ITO e cols., (1985). De qualquer forma, todos estes trabalhos apontam para a função moduladora que os prostanóides exercem sobre as respostas da musculatura lisa traqueal a agonistas exógenos.

IVb) RESPOSTAS RELAXANTES DA CADEIA TRAQUEAL

A existência de contração intrínseca da musculatura traqueal favoreceu seu emprego na análise de agentes espasmolíticos, sendo desnecessário o uso prévio de substâncias contráteis (FOSTER, 1960; ALLEN e cols., 1985). A pre

sença aparentemente exclusiva de receptores adrenérgicos do tipo beta também reforça o papel desta preparação no teste de drogas simpaticomiméticas que poderiam ter algum valor terapêutico na asma brônquica (FOSTER, 1966).

Fazendo um estudo das características eletrofisiológicas do relaxamento pela isoprenalina no músculo traqueal de cobaia "in vitro", ALLEN e cols. (1985) mostram que esta droga, atuando em receptores adrenérgicos beta, causa hiperpolarização da musculatura, provavelmente por aumentar a condutância da membrana ao potássio. O uso prolongado de agonistas do receptor beta pode levar a uma diminuição da sensibilidade do tecido a estes agentes, fenômeno amplamente estudado e conhecido como "dessensibilização" (HOFFMAN & LEFKOWITZ, 1980). Alterações da resposta funcional ao isoproterenol poderiam ser devidas a diminuição do número de receptores beta, quer pela sua deterioração induzida por bactérias patogênicas (ENGELS, OOSTING & NIJKAMP, 1985), quer por alterações relacionadas com o envelhecimento do animal (DUNCAN e cols., 1982; DUNCAN & DOUGLAS, 1985). Os metabólitos do ácido araquidônico também parecem estar envolvidos nos eventos moleculares que levam a dessensibilização (OMINI e cols. 1985).

Não apenas a potência de agonistas e antagonistas beta-adrenérgicos é estudada na musculatura traqueal, como também a de outras substâncias potencialmente úteis no tratamento da asma brônquica, tais como as xantinas (BERTELLI, BIANCHI & BEANI, 1973; ALLEN e cols., 1986a) e bloqueadores dos canais de cálcio (RUSSI & AHMED, 1984; DAYA & JOUBERT, 1986; BABA e cols., 1986).

Os efeitos de várias drogas são mediados por alterações intracelulares dos níveis dos nucleotídeos cíclicos, 3', 5' - monofosfato de adenosina (AMP) e 3', 5' - monofosfato de guanosina (GMP) (KATSUKI & MURAD, 1977). As informações a respeito do papel biológico do AMPc são abundantes, provavelmente por este nucleotídeo ter sido estudado mais precocemente, por um maior número de pesquisadores (IGNARRO & KADOWITZ, 1985). Dentre outros processos biológicos estudados, as respostas relaxantes da musculatura lisa aos agonistas do receptor beta envolvem ativação da adenil-ciclase que, promovendo a síntese de AMPc, aumenta a concentração deste segundo mensageiro no citoplasma (LEFKOWITZ e cols., 1982).

Por sua vez, o AMPc ativa uma série de quinases de proteína, catalisadoras da fosforilação de numerosas enzimas no citoplasma que têm a sua atividade biológica modificada (ROSS & GILMAN, 1985). Já o GMPc, contrariamente ao AMPc, participaria na contração da musculatura lisa, de acordo com o conceito de que estes nucleotídeos deveriam ter efeitos opostos na célula, regulando desta forma a função celular (MURAD & KIMURA, 1974; KUEHL, 1974). Entretanto, demonstrou-se que vários agentes, tanto contráteis como relaxantes, provocavam aumentos nos níveis do GMPc, o que levou a um impasse na interpretação do suposto papel antagonico destes nucleotídeos no ciclo-contração-relaxamento da musculatura lisa, tal como verificado por KATSUKI & MURAD (1977). Estes autores, utilizando a musculatura traqueal de boi, "in vitro", observaram que as respostas contráteis ao carbacol, acetilcolina e histamina eram seguidas de um aumento

na concentração de GMPc, e que o nitroprussiato de sódio, a nitroglicerina e o nitrito de sódio também aumentavam os níveis destes nucleotídeos ao relaxarem a preparação.

Na musculatura lisa vascular, o relaxamento causado pela nitroglicerina, nitroprussiato e drogas correlatas também provoca aumentos da concentração intracelular do GMPc, através de mecanismos intensamente pesquisados (IGNARRO & KADOWITZ, 1985), e que são pouco conhecidos na musculatura lisa respiratória.

De um modo geral, nitritos e nitratos orgânicos relaxam a musculatura lisa vascular por provocarem aumentos dos níveis de GMPc na célula, através da formação de compostos intermediários, óxido nítrico e S-nitrosotióis, que ativam a guanil-ciclase (IGNARRO & GRUETTER, 1980; IGNARRO e cols., 1981). Todo o processo depende de grupos SH teciduais intactos (NEEDLEMAN e cols., 1973), sendo que a depleção destes grupamentos poderia explicar a tolerância observada com o uso contínuo destas drogas (IGNARRO & KADOWITZ, 1985). Sugere-se que o GMPc, através de uma quinase de proteína - dependente de GMPc, fosforile uma bomba de extrusão de cálcio presente no sarcolema das células do músculo vascular, reduzindo assim a concentração intracelular deste íon, com conseqüente relaxamento (POPESCU e cols., 1985). A elucidação dos mecanismos pelos quais os nitrovasodilatadores atuam foi possível, graças à utilização de antagonistas seletivos da guanil-ciclase, tais como a metahemoglobina e o azul de metileno. Ambas drogas mostraram-se capazes de inibir o relaxamento por vários nitro-compostos, assim como o

acúmulo de GMPc. normalmente verificado com o relaxamento (GRUETTER e cols., 1981a). O azul de metileno também inibe a ativação da guanil-ciclase "in vitro" pelo nitrito de sódio (GRUETTER e cols., 1981b) e, ao contrário da metahemoglobina, permeia facilmente as células e antagoniza o relaxamento induzido por, praticamente, todos os nitrovasodilatadores (GRUETTER e cols., 1981a; IGNARRO & KADOWITZ, 1985), sendo o antagonista mais empregado nas pesquisas com os nitro-compostos.

Recentemente, foi observado por ALLEN e cols., (1986b), no músculo traqueal isolado de cobaia, que o azul de metileno antagoniza o relaxamento provocado pelo nitroprussiato, sem modificar o efeito da aminofilina. Este fato confirma os resultados obtidos por KATSUKI & MURAD (1977), anteriormente relatados, de que o nitroprussiato provoca aumentos do GMPc na musculatura traqueal de boi. Portanto, a utilização de um antagonista reconhecidamente seletivo do efeito relaxante dos nitrovasodilatadores permite, de maneira indireta, evidenciar a participação do GMPc na fisiologia da musculatura lisa, quer nos seus aspectos contráteis ou relaxantes.

OBJETIVOS

1. Determinar se as respostas isotônicas da musculatura lisa traqueal de cobaias "in vitro" estão moduladas fisiologicamente e, em caso positivo, algumas características dessa modulação.

2. Verificar se, tal como ocorre na musculatura lisa vascular, as respostas relaxantes do nitroprussiato de sódio no músculo liso traqueal são inibidas pelo azul de metileno.

3. Verificar se o azul de metileno modifica as respostas ao carbacol ou aos estímulos mecânicos, na cadeia traqueal de cobaias.

M A T E R I A L E M É T O D O S

I) MATERIAL

1. ANIMAIS

Foram utilizadas cobaias (Cavia porcellus), machos, albinos, pesando de 500 a 900g, procedentes do Biotério da Companhia Rhodia S/A - Divisão Química - Paulínia. Os animais trazidos deste Biotério (cerca de 10 por mês) eram mantidos no biotério do laboratório, em caixas com maravalha, alimentados diariamente com capim colômbio (Panicum maximum, Jacq.), ração comercial balanceada e água "ad libitum".

2. DROGAS

Foram empregadas as seguintes substâncias:

NOME	PROCEDÊNCIA	ABREVIATURA
. azul de metileno	Merck Sharp & Dohme	AM
. ácido ascórbico	Carlo Erba	
. carbacol	Sigma	CBC
. etanol	Merck Sharp & Dohme	
. indometacina	Merck Sharp & Dohme	IDMTC
. isoproterenol	Sterling-Wintrop	IS
. nitroprussiato de sódio	Baker	NPR

3. SOLUÇÃO NUTRITIVA

Utilizou-se em todos os experimentos a solução de Krebs-Henseleit (K-H), cuja composição é:

. NaCl	119,0 mM.L ⁻¹
. KCl	4,8
. CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,5
. MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,2
. KH ₂ PO ₄	1,2
. NaHCO ₃	24,9
. Glicose	5,0

4. APARELHAGEM

O esquema 1 mostra a cuba de vidro cilíndrica contendo o músculo traqueal, parcialmente imersa no banho sorológico (37°C), que é preenchida com líquido nutritivo (10ml) proveniente de uma bureta. Este líquido é pré-aquecido numa serpentina, mantida no interior do banho. A cuba possui na sua parede, um tubo de vidro em forma de "L" invertido (esquema 2); a este tubo se conecta uma seringa, que serve para se retirar e re-colocar o líquido na cuba, durante a estimulação mecânica. Inferiormente, a cuba é fechada por uma rolhã de borracha, traspassada por três condutos de vidro (esquema 2). Através destes condutos há entrada ou saída de líquido nutritivo, separadamente. O tubo que conduz o carbogênio é recurvado numa das pontas, formando um gancho, aonde se prende uma das extremidades da cadeia traqueal. A outra

extremidade da cadeia é amarrada na alavanca inscritora, tangencial e isotônica, que amplifica a resposta nove vezes. O registro é feito num papel esfumado fixado no cilindro, preso ao eixo do quimógrafo que é mantido sempre na mesma velocidade em todos os experimentos.

II) MÉTODOS

1. PREPARO DAS SOLUÇÕES:

Todas as soluções foram preparadas no momento de sua utilização, sendo mantidas no gelo durante todo experimento.

a. Líquido nutritivo:

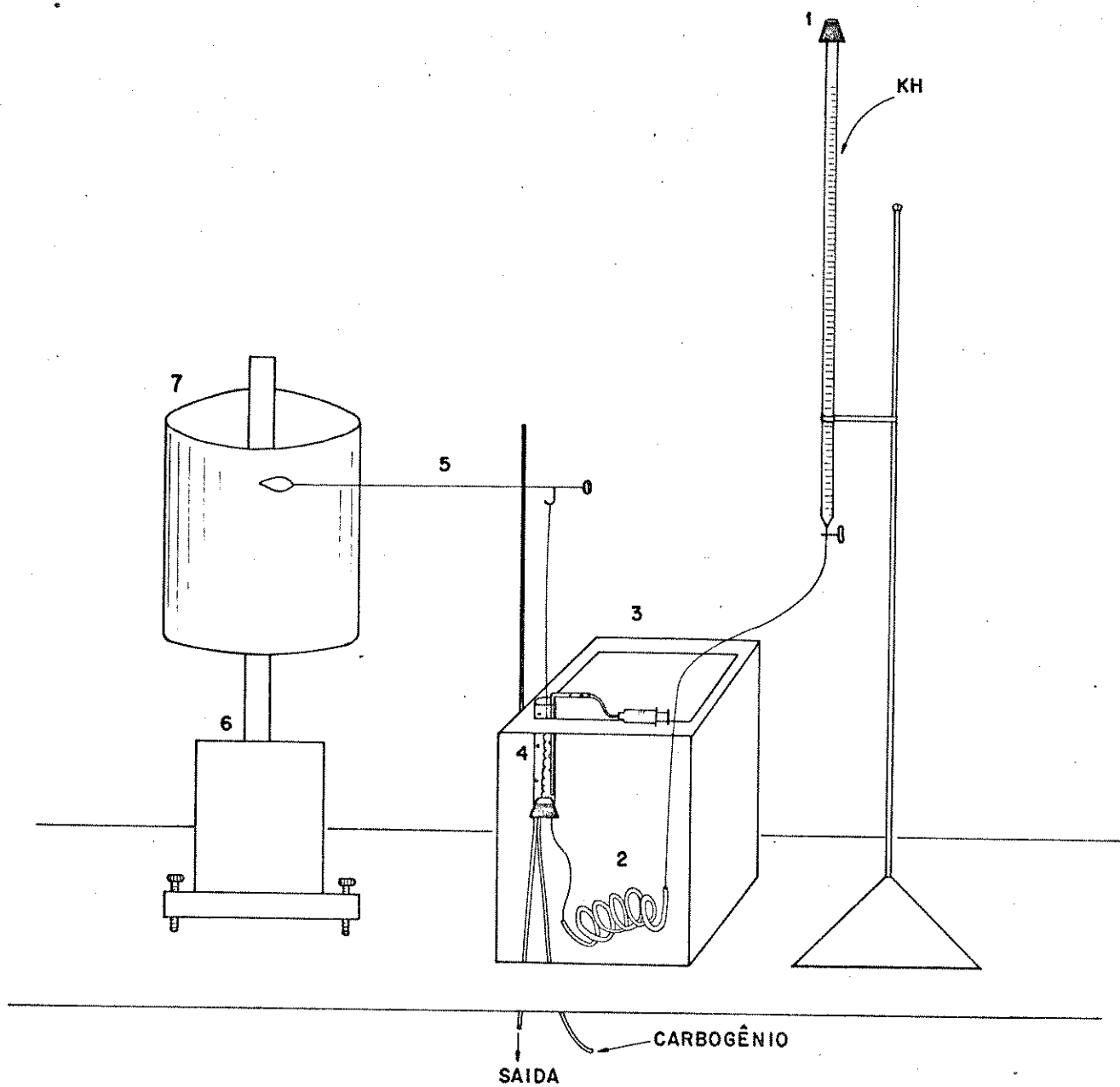
Os componentes do líquido foram dissolvidos em água desionizada, individualmente, com auxílio de um agitador magnético.

b. Solução de nitroprussiato de sódio:

Cristais de NPR foram dissolvidos em água desionisada; a solução era mantida em frasco âmbar, recoberto por uma tira de plástico negro.

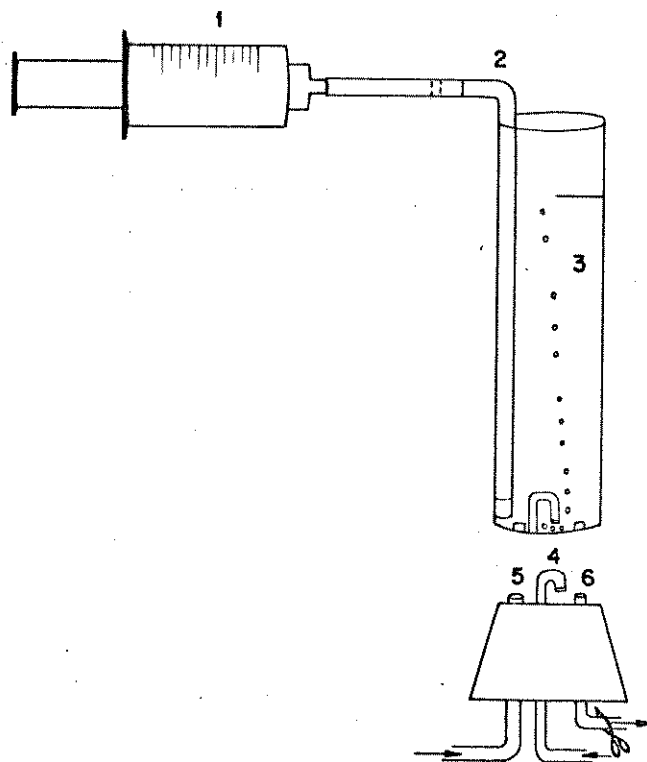
c. Soluções de carbacol e isoproterenol:

CBC e IS foram dissolvidos em água desionizada; a solução de IS adicionava-se ácido ascórbico, numa concentração de 20µg/ml.



Esquema 1

- 1 - Bureta, ligada à serpentina por tubulação de polietileno
- 2 - Serpentina de vidro
- 3 - Banho para temperatura constante
- 4 - Câmara com tubulação interna fixa
- 5 - Alavanca inscritora tangencial
- 6 - Quimôgrafo com ajustadores finos da inclinação
- 7 - Cilindro com papel esfumaçado



Esquema 2

- 1 - Seringa de vidro
- 2 - Tubo em L, de vidro
- 3 - Câmara tubular para perfusão
- 4 - Conduto para entrada de carbogênio
- 5 - Conduto para entrada de líquido nutritivo
- 6 - Conduto para saída de líquido nutritivo

d. Solução de indometacina:

A indometacina foi dissolvida em água desionizada, etanol e solução de Na_2CO_3 2%, na seguinte proporção: 1,5mg IDMTC + 3ml água + 1ml etanol + 1ml Na_2CO_3 2%; 1,5ml desta solução em 1,5L de K-H = $8,4 \times 10^{-7}$ M.

2. MONTAGEM DA CADEIA TRAQUEAL:

Para montagem da preparação foi seguida a técnica descrita por FOSTER (1960), com algumas modificações em relação ao número de anéis utilizados e a amplificação da resposta. Foi mantida a idéia fundamental do método por ele descrito, que é a de se obter um par de cadeias traqueais semelhantes, resultado da permuta dos anéis de duas traquéias distintas. Desta forma, origina-se uma preparação par a partir de um órgão ímpar, cujas respostas são bastante parecidas entre si.

Em nossas condições experimentais, após sacrifício de dois animais por fratura cervical, faz-se uma incisão longitudinal mediana na face ventral do pescoço, sendo o tecido muscular e adiposo adjacentes seccionados ou rebatidos, de tal forma a expor a traquéia desde a origem até sua entrada no tórax. O órgão é cortado logo abaixo da laringe e, introduzindo-se a tesoura na cavidade torácica, cortado anteriormente à carina. Em seguida, os órgãos são colocados em placas de Petri contendo solução nutritiva, à temperatura am

biente e aeradas com 95% de oxigênio em CO₂. Retirado o tecido adiposo e vascular peritraqueais, separam-se doze anéis de cada órgão, sendo seis provenientes da extremidade torácica, e seis oriundos da extremidade cervical, mantidos em grupos separados. Todos são abertos através de secção na cartilagem, no pólo oposto ao do músculo. Cada cadeia traqueal consta de doze anéis abertos, sendo seis proximais e seis distais, de cada animal, ligados entre si por um fio de algodão e as extremidades da cadeia unidas ao fundo da cuba e à alavanca registradora pelo mesmo material.

3. ESTIMULAÇÃO MECÂNICA DA PREPARAÇÃO:

A estimulação mecânica, rotineiramente realizada em nosso laboratório sem o emprego de qualquer aparelho especial, consiste simplesmente na retirada do líquido nutritivo da cuba, submetendo a cadeia traqueal à tensão exercida pelo seu próprio peso. Após 15 segundos, a cuba é preenchida ou com o mesmo líquido que havia sido retirado, procedimento referido como estímulo "simulado" (S), ou com líquido nutritivo novo, referido como "W". O termo "simulado" refere-se apenas à re-utilização da solução nutritiva que estava na cuba, em oposição à "W", que corresponde a uma troca verdadeira do líquido, isto é, a lavada da preparação. Nos dois casos, entretanto, a cadeia traqueal é submetida à mesma estimulação mecânica. Este procedimento, além de simples, tem a vantagem de permitir uniformidade e exatidão de estímulo pa

ra cada músculo, uma vez que em ausência do líquido nutritivo, anula-se o empuxo da massa líquida que sustenta cada cadeia traqueal na cuba, submetendo assim preparações mais ou menos robustas a estímulos proporcionais ao seu peso úmido. A padronização das respostas aos estímulos é alcançada, realizando-os a cada dois minutos, nunca deixando a preparação por um tempo superior a 15 minutos no mesmo Krebs-Henseleit.

4. ABREVIações E TERMOS EMPREGADOS:

1. Estímulo mecânico simulado (S) : estímulo mecânico em que, após 15 segundos da retirada da solução nutritiva, a mesma solução é re-colocada na cuba;

2. Estímulo mecânico "W" : estímulo mecânico em que, retirado o líquido nutritivo da cuba, após 15 segundos ela é preenchida por nova solução de K-H, pré-aquecida.

3. K-H: solução de Krebs-Henseleit;

4. Níveis de contração do músculo traqueal:

a. nível 1: amplitude da contração atingida espontaneamente pela preparação, no equilíbrio, nas condições experimentais.

b. nível 2: nível de contração máxima atingida pela cadeia traqueal submetida aos

estímulos mecânicos repetidos.

c. nível 3: corresponde à resposta contrátil máxima da preparação, sob efeito de um agonista total.

5. Nível zero: estado de relaxamento máximo da preparação;

6. Par de cadeias traqueais: duas cadeias traqueais que foram montadas de acordo com o método descrito anteriormente.

7. Resposta contrátil intrínseca: contração inerente ao músculo liso traqueal, que ocorre sem a adição de qualquer droga ao banho, espontaneamente (SPT) ou em decorrência da estimulação mecânica (ST).

RESULTADOS

I. RESPOSTAS CONTRÁTEIS AOS ESTÍMULOS MECÂNICOS

A cadeia traqueal completamente relaxada e mantida em repouso na cuba, por um período de 65 minutos (FIG. 1) , desenvolve uma resposta contrátil espontânea, de amplitude variável, atingindo um nível estável ao qual denominamos nível 1. Estímulos mecânicos feitos a partir deste nível provocam uma contração adicional da preparação, em maior ou menor grau, levando-a a se estabilizar em um novo estado contrátil, nível 2. Com a adição de isoproterenol ($IS-8,0 \times 10^{-7}M$) ao banho, a preparação se relaxa, atingindo o nível zero . Após três ou quatro substituições do fluido perfusor, que permitem a completa retirada do agonista beta, verifica - se que a estimulação mecânica intermitente realizada já a partir do nível zero (curva 2), não só acelera a evolução da contração intrínseca, como também, em condições ótimas, a mantém em nível constante - nível 2 - mais elevado do que o atingido espontaneamente.

Em determinadas condições, a amplitude da respos- ta contrátil atingida espontaneamente pode ser bastante próxima daquela atingida pela estimulação mecânica, como mostra a FIG. 2, onde também se nota a semelhança de respostas obtidas nas duas preparações.

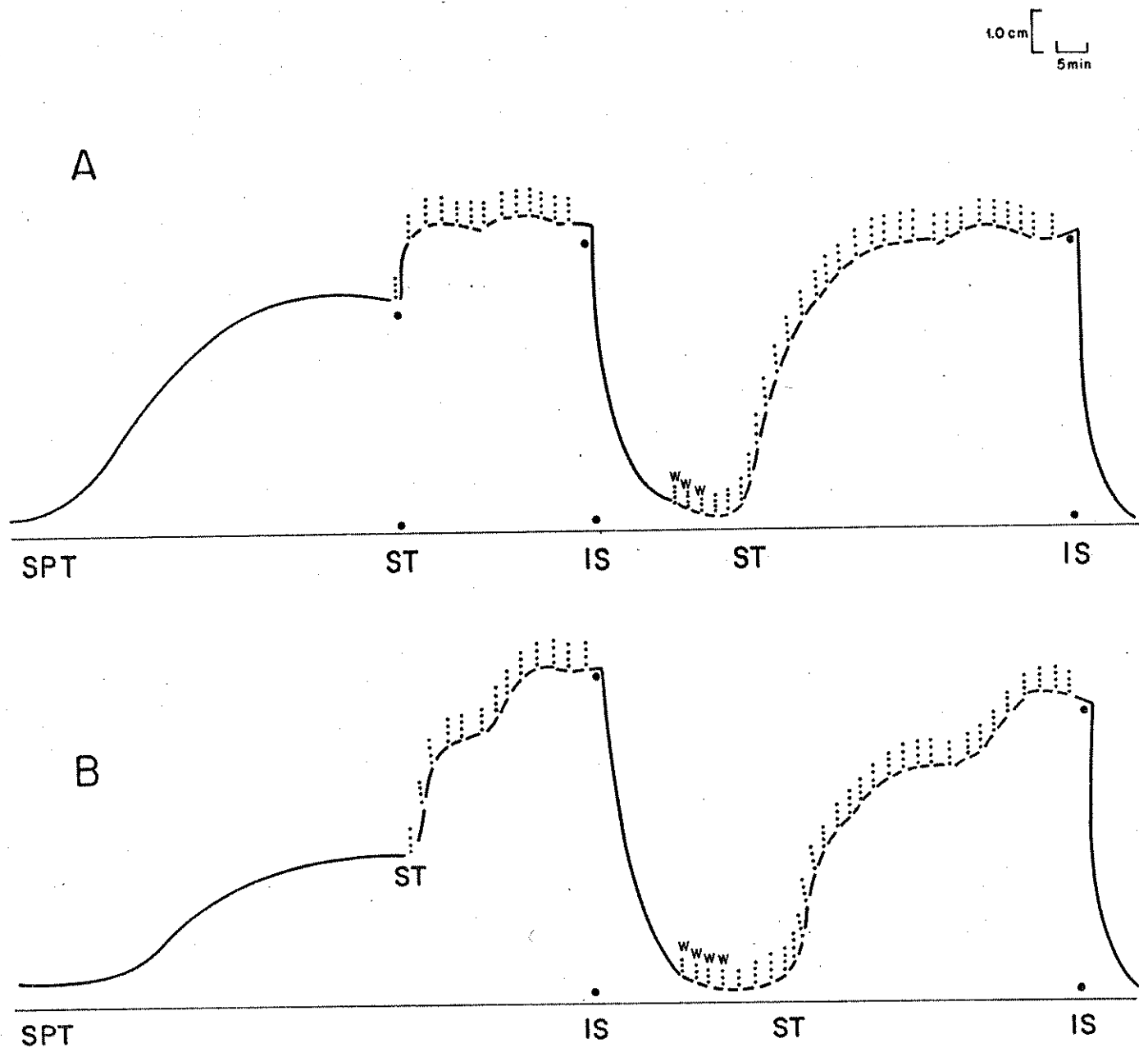


FIG. 1 - Respostas contráteis espontânea e estimulada mecanicamente (ST), de um par de cadeias traqueais (A e B). As barras verticais pontilhadas indicam, nesta e demais figuras, os momentos em que os estímulos foram realizados. IS indica ponto de adição do isoproterenol, $8,0 \times 10^{-7}M$. "W" indica lavagem da preparação.

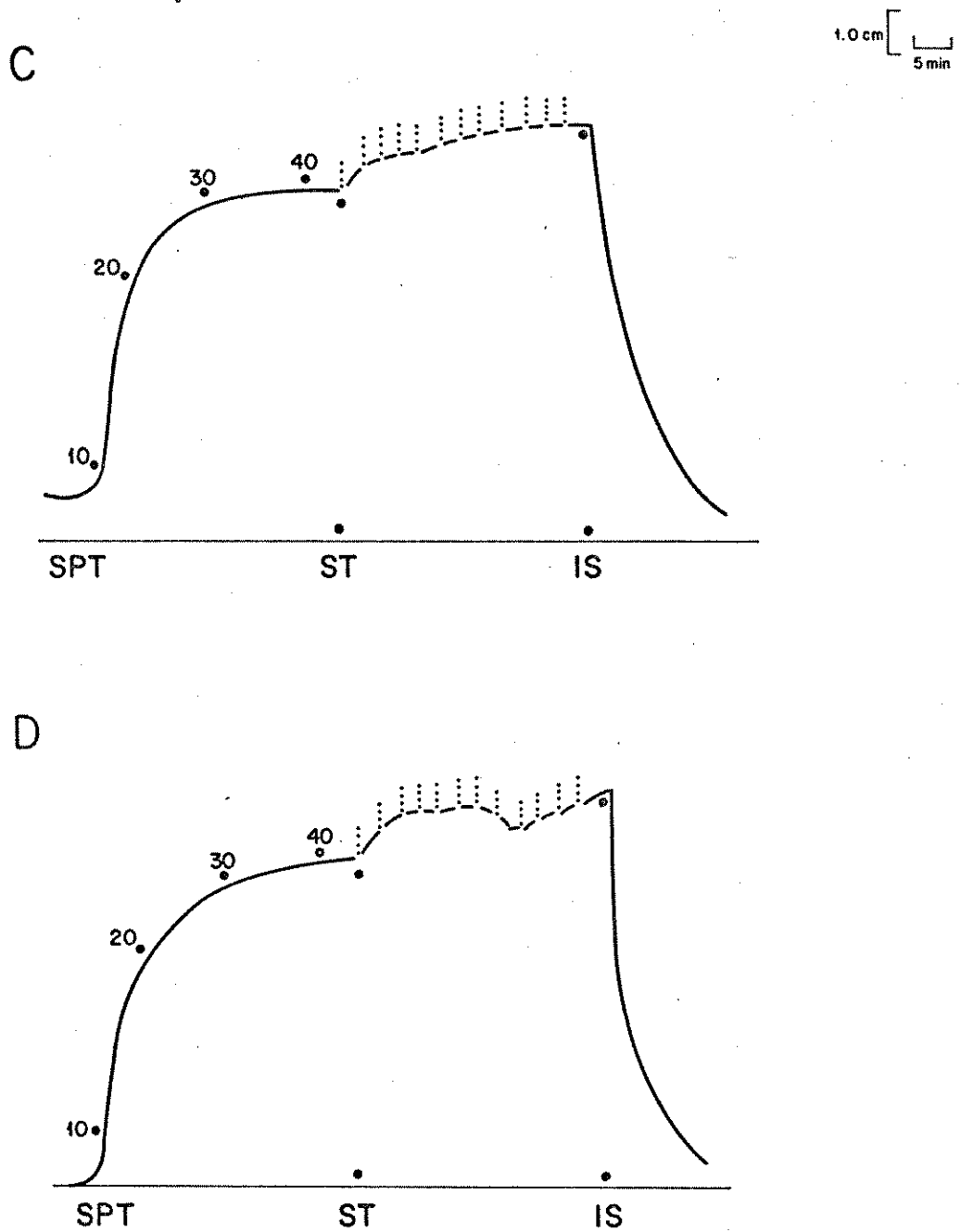


FIG. 2 - Par de cadeias traqueais (C e D) mostrando a contração espontânea (SPT) e aos estímulos mecânicos (ST); relaxamento pelo IS, $8,0 \times 10^{-7}M$. Os números sobre as curvas SPT indicam o tempo (minutos) de desenvolvimento da resposta.

II. RESPOSTAS CONTRÁTEIS AO CARBACOL

A evolução temporal das respostas contráteis ao carbacol (CBC) e aos estímulos mecânicos (ST), em termos percentuais, está representada graficamente na FIG. 3. Pode-se notar que o CBC, nas concentrações $1,6 \times 10^{-7} M$, $2,2 \times 10^{-7} M$ e $2,7 \times 10^{-7} M$ (curvas 5, 6 e 7), provoca contração de aproximadamente 90% da capacidade total de resposta. Chamamos de nível 3 a este valor máximo atingido pela preparação. Quando baixamos a concentração para $1,1 \times 10^{-7} M$ (curva 4) a resposta gira em torno de 80% da capacidade máxima e, nas menores concentrações utilizadas ($2,7 \times 10^{-8} M$ - curva 2 e $5,5 \times 10^{-8} M$ - curva 3), o CBC induz respostas contráteis de 65 a 70% do efeito máximo. Verifica-se, ainda na FIG. 3, que a capacidade contrátil aos estímulos mecânicos (curva 1) corresponde a 48%, aproximadamente do nível 3. É interessante observar - que a estabilização da curva a todas as doses utilizadas de CBC ocorreu aos 20-25 minutos de contato com o agonista muscular. A resposta aos estímulos mecânicos se desenvolve mais lentamente, mas também atinge o platô aos 20-30 minutos de estimulação, o que corresponde a realização de 10 a 15 estímulos no total.

A FIG. 4 mostra o registro original do efeito contrátil de diferentes concentrações de CBC, adicionado sempre no nível zero, após a preparação ter sido relaxada com IS, $1,6 \times 10^{-6} M$. A semelhança do observado no gráfico da FIG. 3, curva 7, a resposta a dose de $2,7 \times 10^{-7} M$ também foi máxima, ou seja, levou a preparação até o nível 3; as respostas às

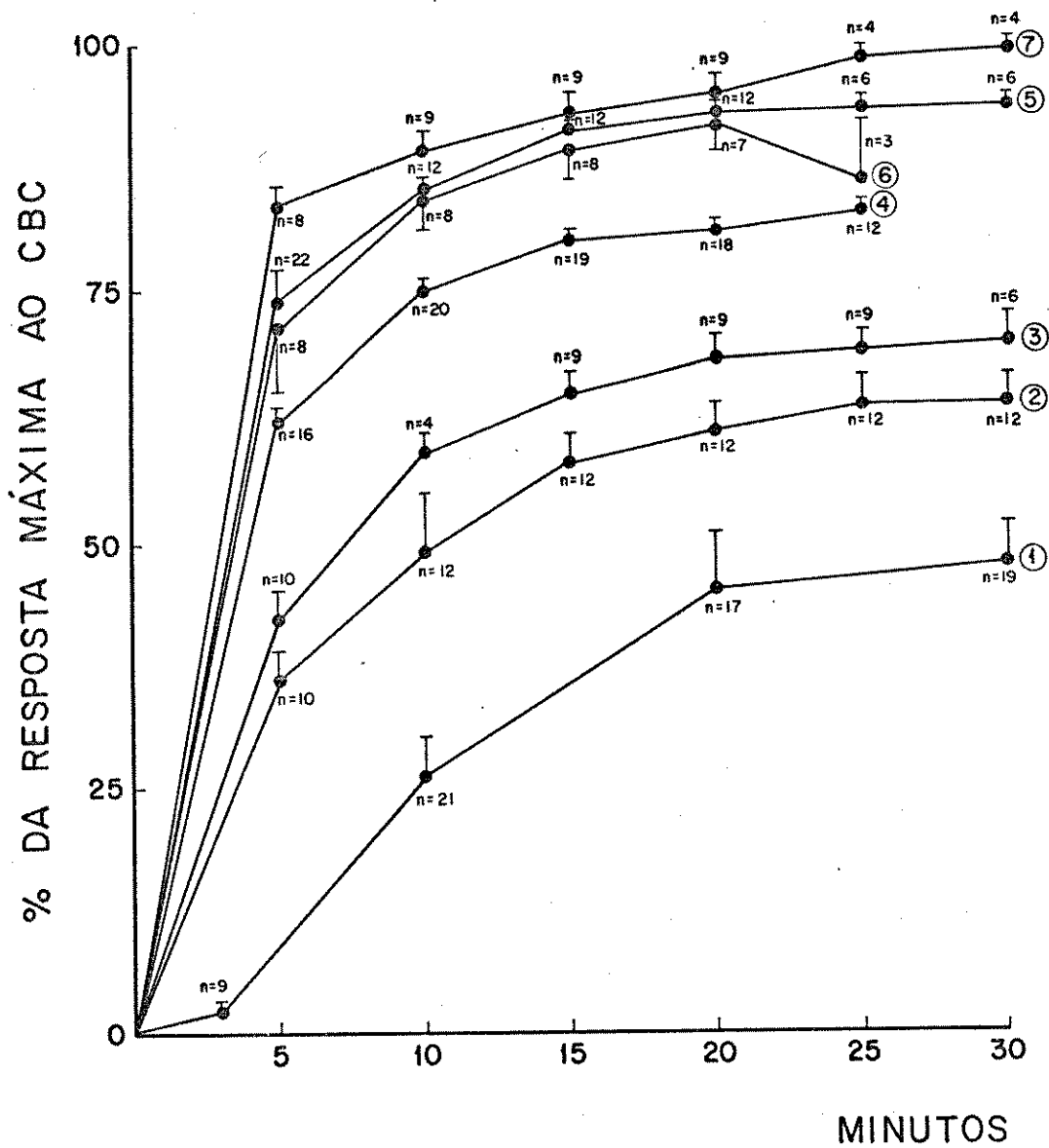


FIG. 3 - Respostas contráteis ao CBC ou aos estímulos mecânicos (curva 1), em termos percentuais. Doses de CBC: $2,7 \times 10^{-8}M$, $5,5 \times 10^{-8}M$, $1,1 \times 10^{-7}M$, $1,6 \times 10^{-7}M$, $2,2 \times 10^{-7}M$ e $2,7 \times 10^{-7}M$, respectivamente para as curvas 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Cada ponto indica a média de (n) observações, com seus respectivos erros padrão.

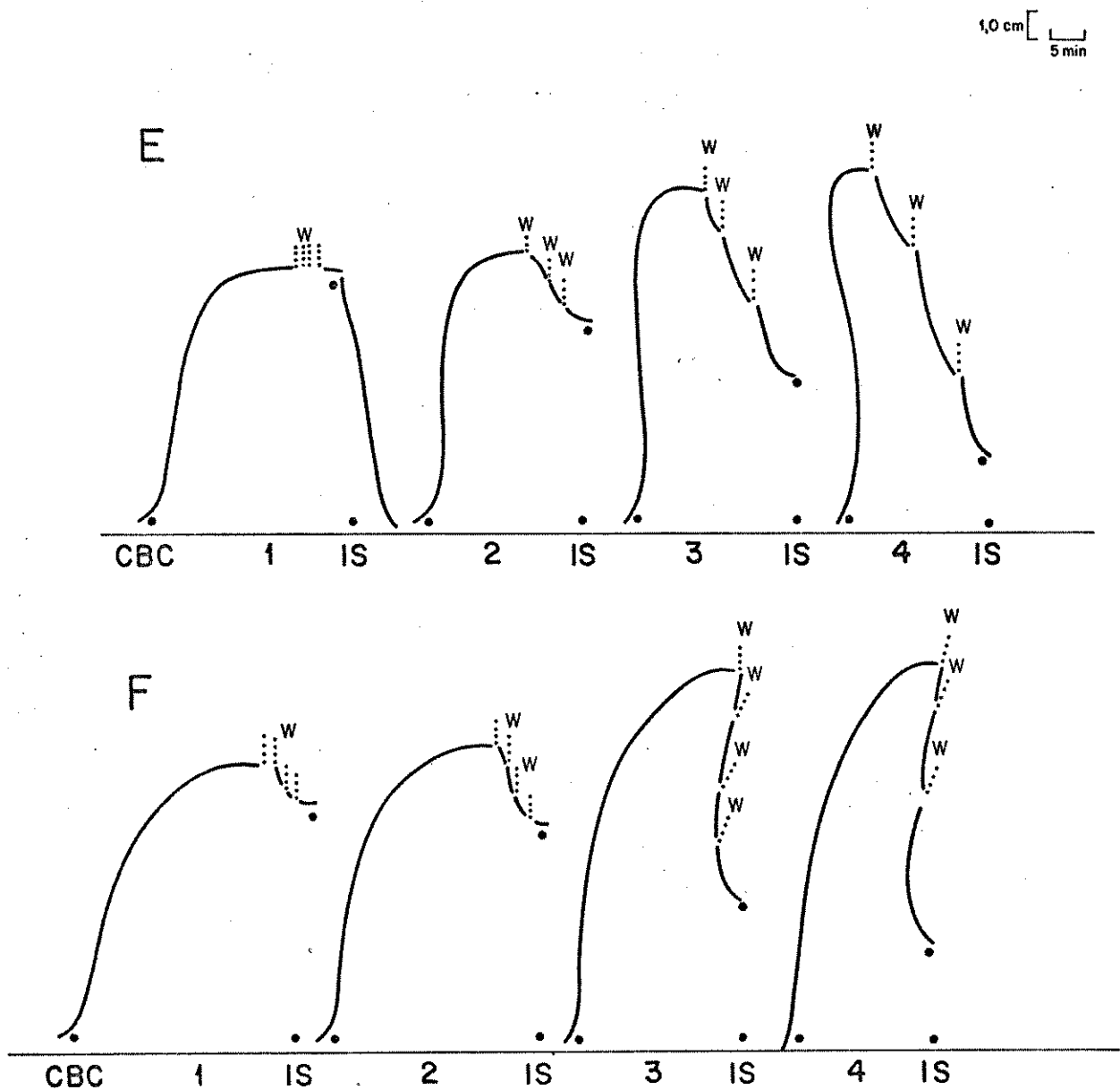


FIG. 4 - Par de cadeias traqueais (E e F) contraídas pelo CBC, nas concentrações de $2,7 \times 10^{-8}M$, $5,5 \times 10^{-8}M$, $2,7 \times 10^{-7}M$ e $5,5 \times 10^{-7}M$ (curvas 1, 2, 3 e 4, respectivamente). O CBC foi retirado do banho, repetindo-se três vezes a lavagem da preparação, que então demarca, horizontalmente, o nível máximo de relaxamento nesta condição. IS, na concentração de $1,6 \times 10^{-6}M$.

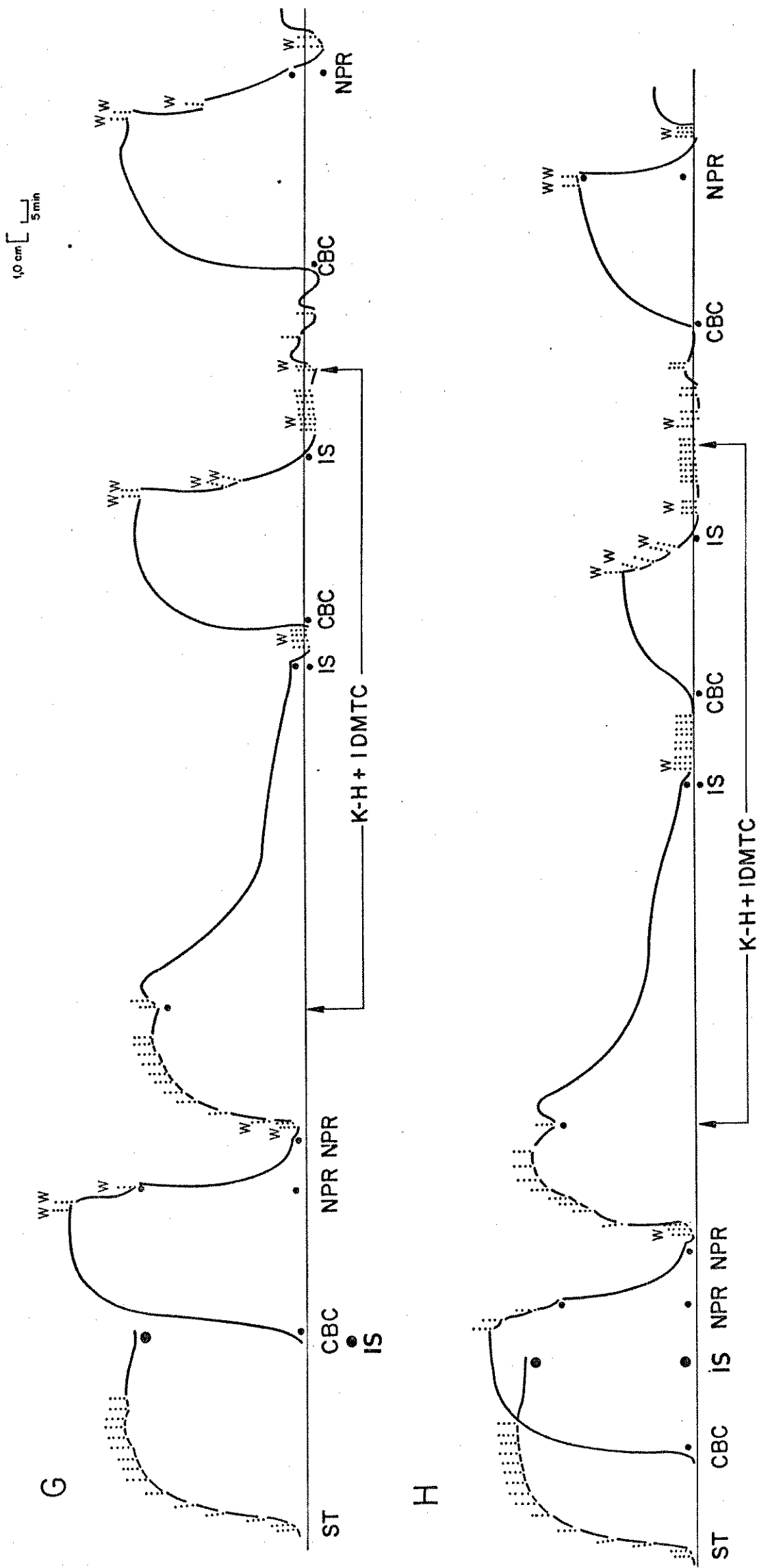
concentrações de $2,7 \times 10^{-8} \text{M}$ e $5,5 \times 10^{-8} \text{M}$ foram sub-máximas e bastante semelhantes entre si. Quando, após obtenção de resposta máxima ao CBC este é retirado por lavagens sucessivas da preparação, esta experimenta relaxamento que é sempre parcial, obtendo-se deste modo um traçado horizontal estável e constante, desde que o sistema intrínseco modulador do tono esteja intacto (não mostrado). Pode-se observar que o nível em que se dá a estabilização do traçado (FIG. 4), depende da concentração de CBC empregada: quanto maior a concentração do agonista, maior o relaxamento ocorrido em consequência da sua retirada. Observe que na primeira curva, preparação E, a musculatura não se relaxou depois da retirada do agente contrátil.

III. EFEITOS DA INDOMETACINA NAS RESPOSTAS CONTRÁTEIS AO CBC

As respostas contráteis ao CBC ($2,7 \times 10^{-8} \text{M}$ e $5,5 \times 10^{-8} \text{M}$) e aos estímulos mecânicos, em ausência e em presença de indometacina (IDMTC - $2,8 \times 10^{-7} \text{M}$) estão registrados na FIG. 5. As duas primeiras curvas obtidas de cada preparação, quer aos estímulos mecânicos (curva 1), quer ao CBC (curva 2), mostram a responsividade da musculatura traqueal sob condições controle. Nota-se o rápido desenvolvimento da curva estimulada mecanicamente (ST) e a manutenção do tono contrátil no nível 2, em ausência de estimulação por um período de 15 minutos. Em relação à resposta contrátil ao

CBC (curva 2), observa-se que retirando-se o agonista, a preparação não se relaxa completamente, atingindo altura correspondente ao nível 2; o relaxamento completo foi obtido pela adição de nitroprussiato de sódio na concentração final de $2,6 \times 10^{-6} M$. Durante as quatro lavagens feitas para retirar a substância relaxante, pode-se observar resposta contrátil imediata, cuja progressão é acelerada por estímulos mecânicos repetidos (curva 3). No platô da segunda curva ST, a adição de K-H contendo IDMTC, $2,8 \times 10^{-7} M$, provoca relaxamento lento da musculatura, que atinge o nível zero em cerca de 80 minutos, quando então estímulos mecânicos subseqüentes não mais provocam contração. Os efeitos do CBC, nas concentrações de $2,7 \times 10^{-8} M$ (H) e $5,5 \times 10^{-8} M$ (G) apresentam-se diminuídos em cerca de 67 e 30%, respectivamente. Agora, em ausência do agente contrátil no platô da curva, ambas preparações relaxam-se, atingindo o nível zero rapidamente, não havendo efeito adicional do IS. Ainda na FIG. 5, observa-se, ao retornar-se ao K.H. sem IDMTC, que as respostas às duas concentrações de CBC continuaram inibidas em aproximadamente 50% (CBC - $2,7 \times 10^{-8} M$) e 20% (CBC - $5,5 \times 10^{-8} M$). Reti-rado o CBC e acelerando-se o relaxamento com NPR, $2,0 \times 10^{-6} M$, observa-se que ambas preparações apresentaram pequena contração aos estímulos mecânicos, que se manteve constante.

Os efeitos da IDMTC, nas concentrações de $8,4 \times 10^{-7} M$ e $8,4 \times 10^{-5} M$, sobre as respostas contráteis ao CBC e aos estímulos mecânicos, podem ser observados na FIG. 6. O par de cadeias traqueais apresenta tono intrínseco bastante deseenvolvido, cuja amplitude corresponde a 80% da capacidade contrátil máxima da musculatura; o CBC, na baixa concentração

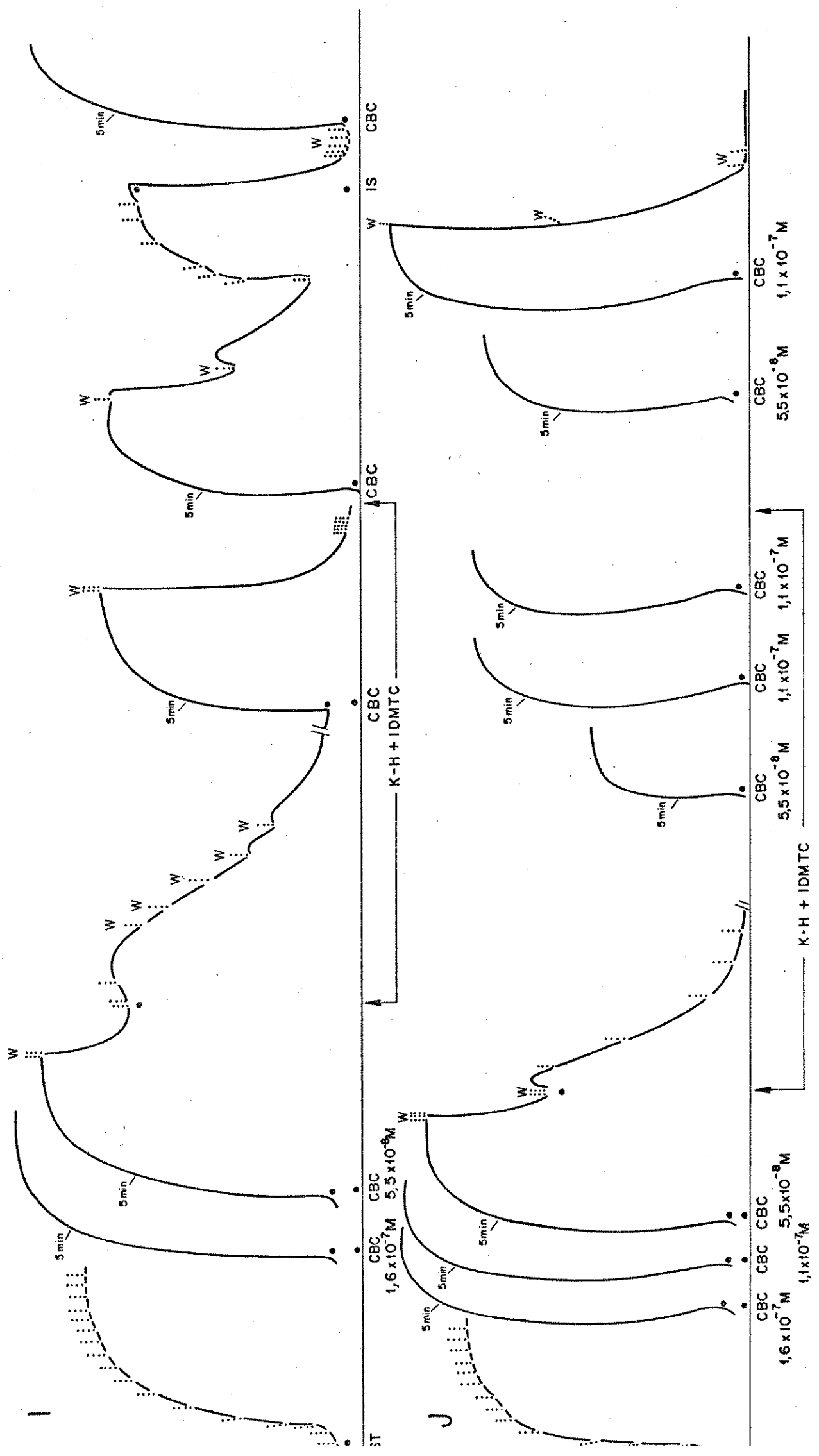


IG. 5 - Par de cadeias traqueais G, H, mostrando respostas contráteis aos estímulos mecânicos (ST) e ao CBC ($2,7 \times 10^{-7}M$) em H e $5,5 \times 10^{-8}M$, em G), antes, durante e após supressão da IDMTC ($2,8 \times 10^{-7}M$). Relaxamento induzido pelo ($8,0 \times 10^{-7}M$) ou pelo NPR (concentração final $2,6 \times 10^{-6}M$).

de $5,5 \times 10^{-8} M$, produziu resposta praticamente máxima, cerca de 90% do nível 3. Pode-se verificar que, tal como exposto nas FIGS. 4 e 5, retirando-se o CBC no platô da curva, a musculatura se relaxa parcialmente; entretanto, em presença de IDMTC o relaxamento é progressivo e não é afetado pelos estímulos mecânicos subsequentes. Após período de 80 e 60 minutos, as preparações chegam ao nível zero, não havendo respostas aos estímulos então realizados. Na preparação I, com IDMTC $8,4 \times 10^{-7} M$, o efeito do agonista muscarínico ($5,5 \times 10^{-8} M$) está diminuído de aproximadamente 20% da amplitude máxima obtida nas condições controle. Após 3 horas e meia de contato com a IDMTC, esta foi removida, quando voltamos a testar as respostas ao CBC. A primeira curva manteve a inibição anterior mas, em ausência do agonista, nota-se que a musculatura recuperou a capacidade de resposta aos estímulos mecânicos. Na preparação J, as respostas ao CBC nas duas concentrações utilizadas, foram intensamente inibidas em presença do agente anti-inflamatório; pode-se verificar que, não apenas a amplitude da concentração está menor, como também o desenvolvimento da curva foi bastante prejudicado. Retornando-se ao K-H normal, observa-se recuperação parcial da resposta à menor concentração de CBC ($5,5 \times 10^{-8} M$), semelhante à da preparação I, ainda em presença do inibidor. Por sua vez, o efeito da maior concentração de CBC apresentou amplitude e desenvolvimento normais, tal como verificado nas condições controle.

Experimentos subsequentes permitiram verificar que, dependendo da concentração de CBC utilizada, a resposta contrátil apresentava-se intensamente diminuída ou inalterada,

1,0 cm [5 min



... e ... aumento ...

em presença de IDMTC, o que pode ser observado na FIG. 7. O valor máximo (100%) corresponde ao pico da contração para cada concentração de CBC obtido em condições controle, isto é, em ausência de IDMTC. Em função deste valor foi calculada, para as concentrações individuais de CBC, a resposta percentual ocorrida em presença de IDMTC e a recuperação da sua atividade após retorno ao K-H sem inibidor. Assim, os efeitos máximos em presença da IDMTC são semelhantes àqueles das condições controle. De modo geral, em presença de IDMTC, nas concentrações de $5,6 \times 10^{-7} \text{M}$ e $8,4 \times 10^{-7} \text{M}$, a contração ao CBC, $2,7 \times 10^{-8} \text{M}$, esteve diminuída em cerca de 60% (painel A) e 50% (painel B); para a concentração de $5,5 \times 10^{-8} \text{M}$ de CBC houve diminuição de 20% (painel B). As maiores concentrações do agonista muscarínico produziram respostas aumentadas ($2,2 \times 10^{-7} \text{M}$ - painel A) ou inalteradas ($1,1 \times 10^{-7} \text{M}$ a $5,5 \times 10^{-7} \text{M}$ - painel B). Retornando-se ao K-H simples (painel B), apenas um efeito contrátil permaneceu reduzido (CBC- $2,7 \times 10^{-8} \text{M}$), tendo os demais atingido os níveis controle individuais para cada concentração de CBC ($1,6 \times 10^{-7} \text{M}$ e $5,5 \times 10^{-7} \text{M}$). A IDMTC, $8,4 \times 10^{-5} \text{M}$ (painel C), inibiu as respostas ao CBC em torno de 85% (CBC - $2,7 \times 10^{-8} \text{M}$), 50% (CBC - $5,5 \times 10^{-8} \text{M}$), 15% (CBC - $1,1 \times 10^{-7} \text{M}$) e 10% (CBC - $1,6 \times 10^{-7} \text{M}$), efeitos estes prontamente revertidos voltando-se ao K-H normal, apenas para as maiores concentrações do agonista ($1,1 \times 10^{-7} \text{M}$ e $1,6 \times 10^{-7} \text{M}$ - painel C); as respostas às menores concentrações permaneceram reprimidas, num nível semelhante ao obtido com a concentração de IDMTC usada anteriormente (painel B).

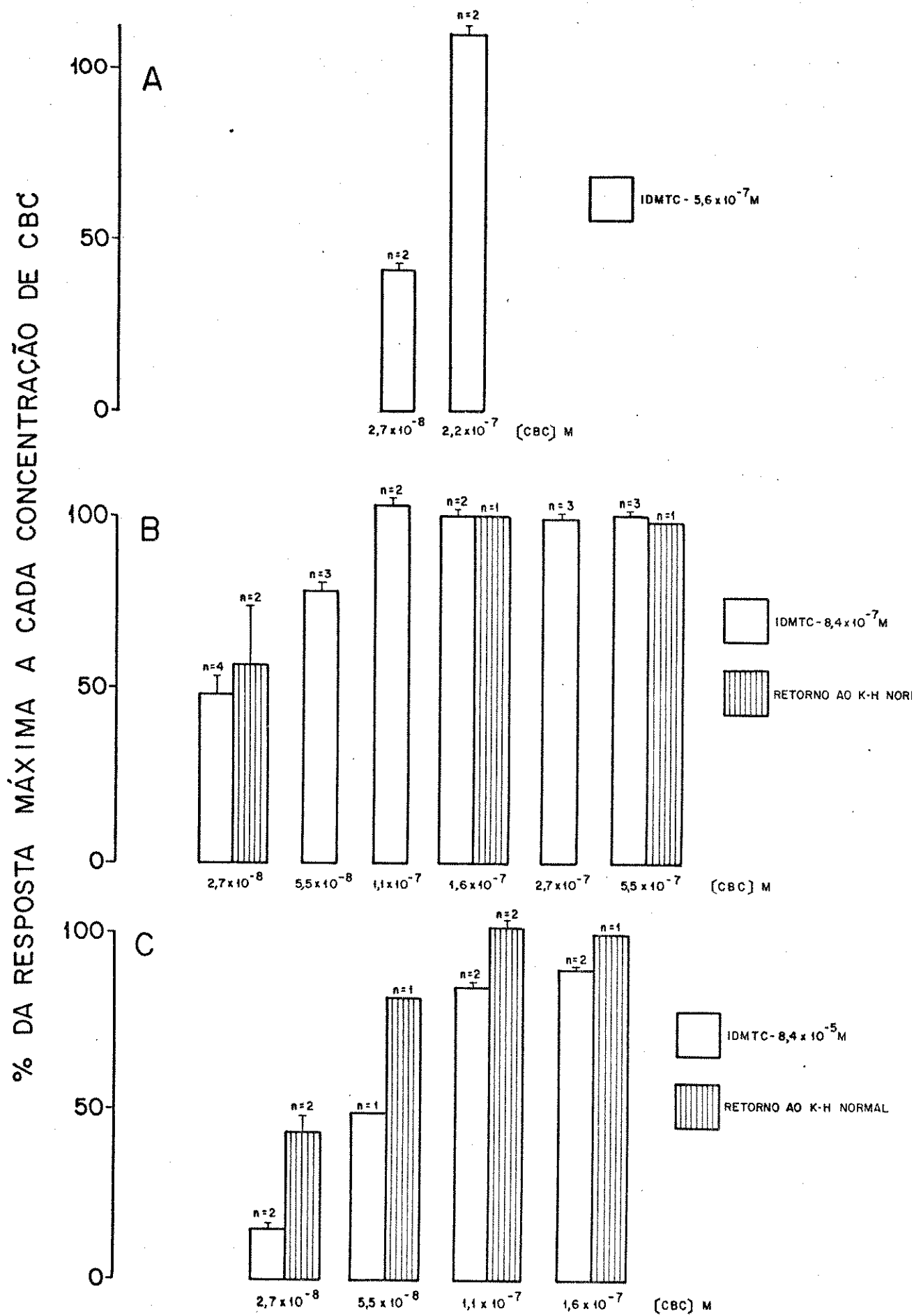


FIG. 7 - Efeitos da IDMTC, em três diferentes concentrações, sobre as respostas do CBC, e recuperação da atividade contrátil.

IV. RESPOSTAS RELAXANTES AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO.

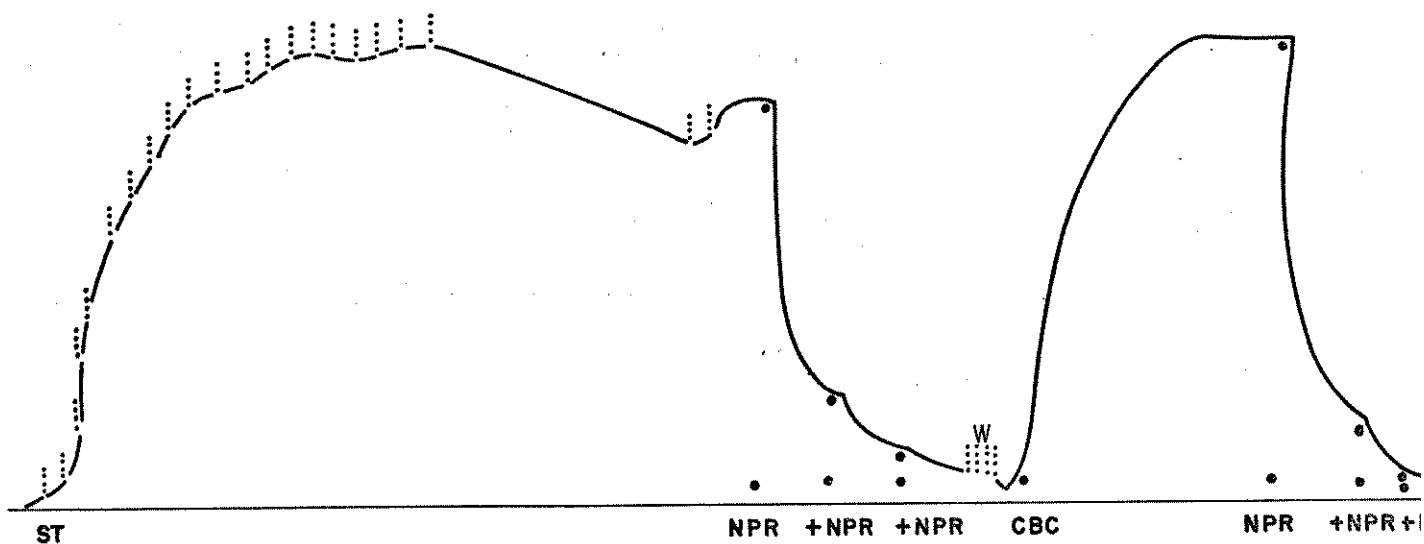
As respostas relaxantes ao nitroprussiato de sódio (NPR) foram obtidas estando a musculatura traqueal no máximo de contração quer por estímulos mecânicos, quer pelo carbacol (CBC).

Mostramos o relaxamento completo pelo NPR de contrações provocadas por baixas concentrações de CBC ou pelos estímulos mecânicos (FIG. 8), cujos valores máximos são bastante próximos entre si. Observa-se, ainda, a semelhança com que estas respostas contrátil e relaxante são evidenciadas em ambas preparações K e L. O NPR adicionado inicialmente, no platô de cada curva, $6,8 \times 10^{-7} M$, não produz relaxamento completo mas, re-colocado cumulativamente, em duas adições de $3,4 \times 10^{-7} M$, provoca relaxamento praticamente completo da musculatura traqueal.

Que o relaxamento pelo NPR é dose-dependente pode ser verificado nas figuras 9 e 10. Para facilitar a exposição dos resultados, suprimimos o registro das lavadas da preparação bem como os relaxamentos provocados pelo isoproterenol (IS), os quais são foram exibidos nas primeiras curvas da FIG. 10. Uma vez atingida a resposta máxima para cada concentração de NPR, as preparações eram lavadas (W) para retirada do agonista e do nitro-composto e levadas à linha base pelo IS. As figuras 9 e 10 também mostram o efeito do NPR ao longo do tempo, quer alternando-se as

1.0 cm
5 min

K



L

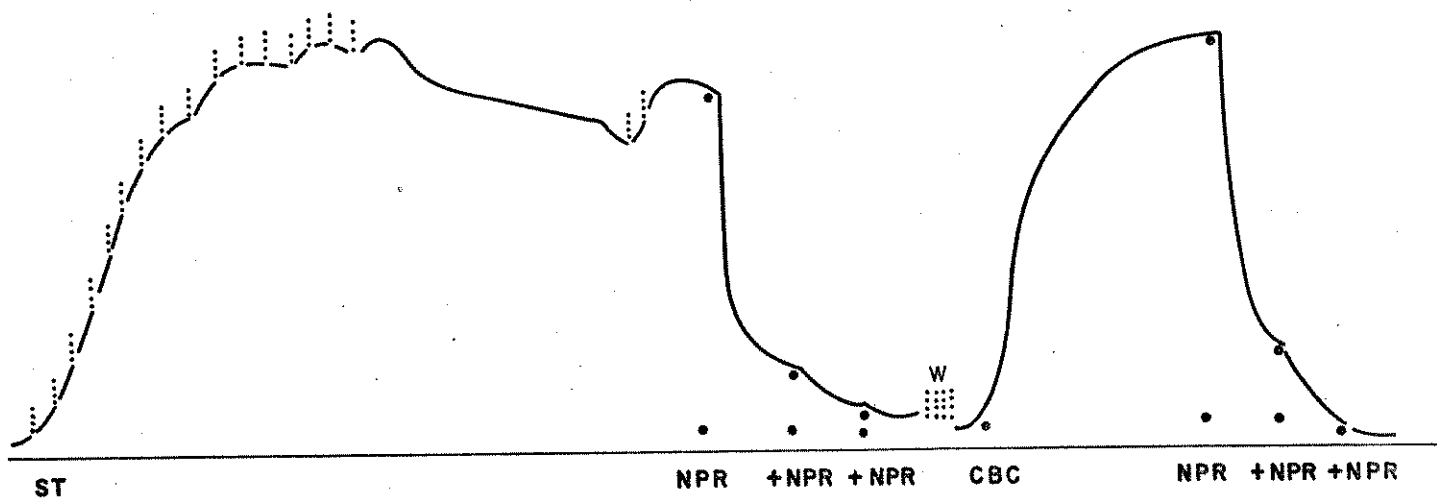


FIG. 8 - Relaxamento produzido pelo NPR, $6,8 \times 10^{-7}M$, suplementada por duas adições cumulativas (+) até fazer $1,3 \times 10^{-6}M$, em um par de cadeias traqueais (K e L) contraídas por estimulação mecânica (ST) ou pelo CBC, $2,7 \times 10^{-8}M$. Entre as curvas ST e CBC, a preparação foi lavada 4 vezes.

concentrações (FIG. 9), quer fazendo-se adições repetidas de uma mesma, (FIG. 10), a cada contração ao CBC. Observamos - que as três concentrações de NPR utilizadas, $6,7 \times 10^{-7} M$, $2,0 \times 10^{-6} M$ e $3,4 \times 10^{-6} M$, FIG. 9, produzem relaxamentos parciais de 12 (n=2), 48 (n=2) e 68% (n=2), respectivamente, curvas 1, 2 e 3, e relaxamentos de 5 (n=2), 43 (n=2) e 56% (n=2), nas curvas 4, 5 e 6, sobre as respostas máximas a $1,1 \times 10^{-7} M$ de CBC. Estes valores mostram uma diminuição do efeito do nitro-composto, mais intensa para a menor dose de NPR utilizada. Observe, ainda, que o relaxamento sempre se completou aos 5 minutos do contato com o antagonista.

Com a adição repetida de NPR (FIG. 10), em presença do agonista muscarínico, pode-se notar que ocorrem relaxamentos sempre incompletos para a concentração de $6,7 \times 10^{-7} M$ (preparação P), enquanto que em concentração dez vezes maior o nível zero é sistematicamente atingido (preparação 0). Tal como observado na figura anterior, o efeito máximo induzido pelo nitro-composto também se completou após 5 minutos da sua adição ao banho. As velocidades de contração do CBC, neste e demais experimentos em que foi utilizado, são adequadamente avaliadas a partir do tempo conforme registrado sobre seus traçados, contado desde o instante da adição do agonista ao banho.

As respostas relaxantes às várias doses de NPR (FIG. 11), em presença de concentrações crescentes de CBC mostram que para uma mesma concentração de nitro-composto, o relaxamento obtido é inversamente proporcional à dose de CBC utilizada, isto é, o relaxamento mais intenso corresponde

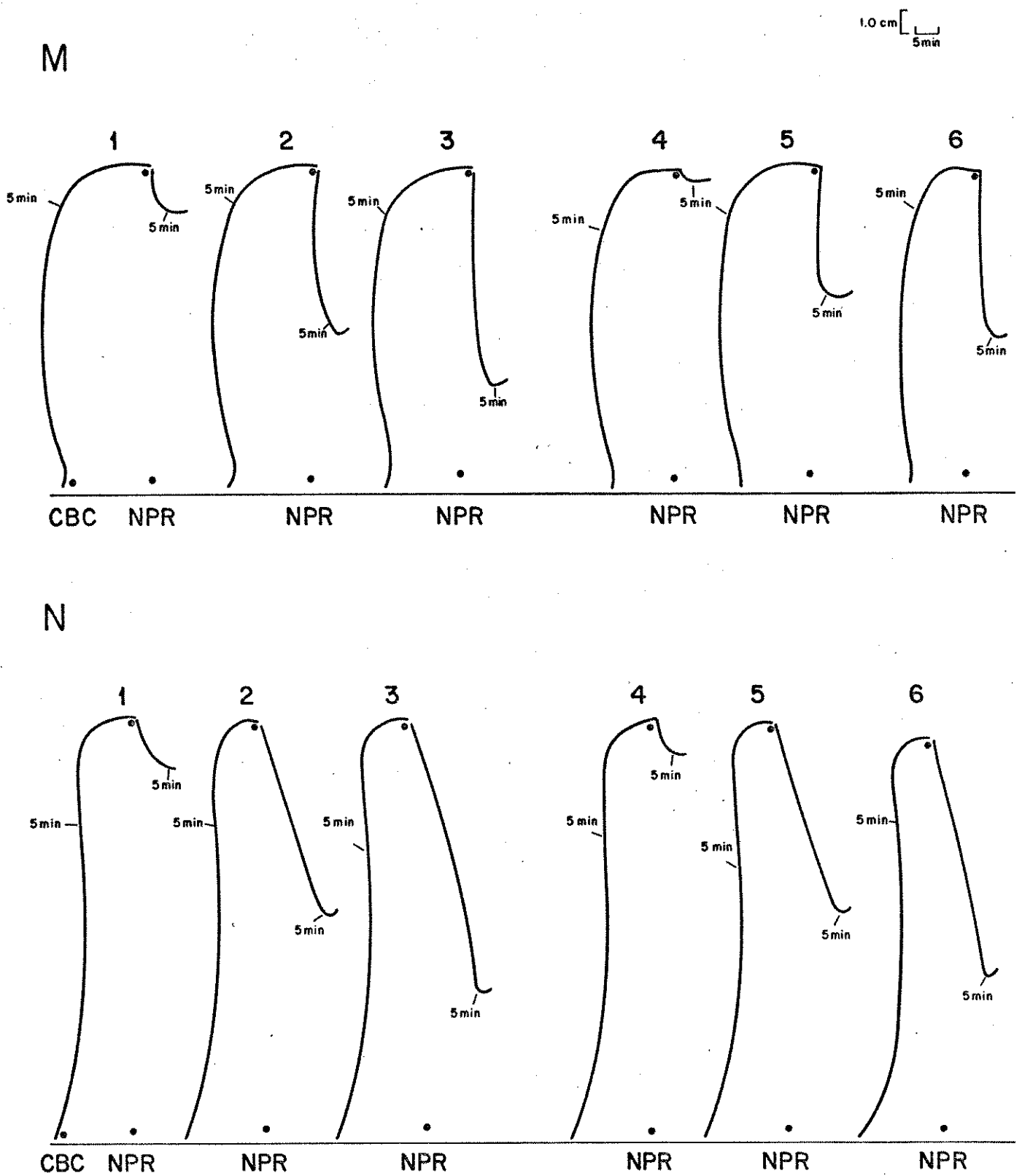


FIG. 9 - Respostas relaxantes ao NPR, nas concentrações de $6,7 \times 10^{-7}M$, curvas 1 e 4; $2,0 \times 10^{-6}M$, curvas 2 e 5 e $3,4 \times 10^{-6}M$, curvas 3 e 6, partindo da resposta máxima ao CBC, na concentração de $1,1 \times 10^{-7}M$.

ã menor concentração de CBC presente no banho. As barras - tracejadas ressaltam o efeito dose-dependente do relaxante. Aumentando-se a concentração do nitro-composto, são obtidas respostas proporcionalmente maiores, estando a preparação - contraída por uma mesma dose de CBC ($1,1 \times 10^{-7} \text{M}$). Observa - se também, tal como verificado anteriormente (FIG. 10), que na concentração de $6,8 \times 10^{-6} \text{M}$ o NPR relaxa a musculatura até o nível zero, quando o agonista está na concentração de $1,1 \times 10^{-7} \text{M}$.

V. EFEITOS DO AZUL DE METILENO.

V.1. Sobre as respostas contráteis ao carbacol:

A resposta contrátil a uma dose sub-máxima de CBC, em termos percentuais, em ausência ou em presença de azul - de metileno (AM), pode ser observada na FIG. 12. Foram realizadas três curvas ao CBC em condições normais e três curvas em presença do AM. Esta droga foi adicionada, primeiramente, no início da resposta contrátil ao agonista, isto é, antes do terceiro minuto, num estágio mais próximo do platô (5 minutos) ou ainda, já no pico da resposta contrátil. Este procedimento teve como objetivo surpreender eventual diferença de ação do AM sobre a preparação, em que pudesse haver condições não iguais de atuação do sistema modulador do tono. Observa-se que o AM não provoca qualquer alteração da resposta contrátil ao agonista muscarínico.

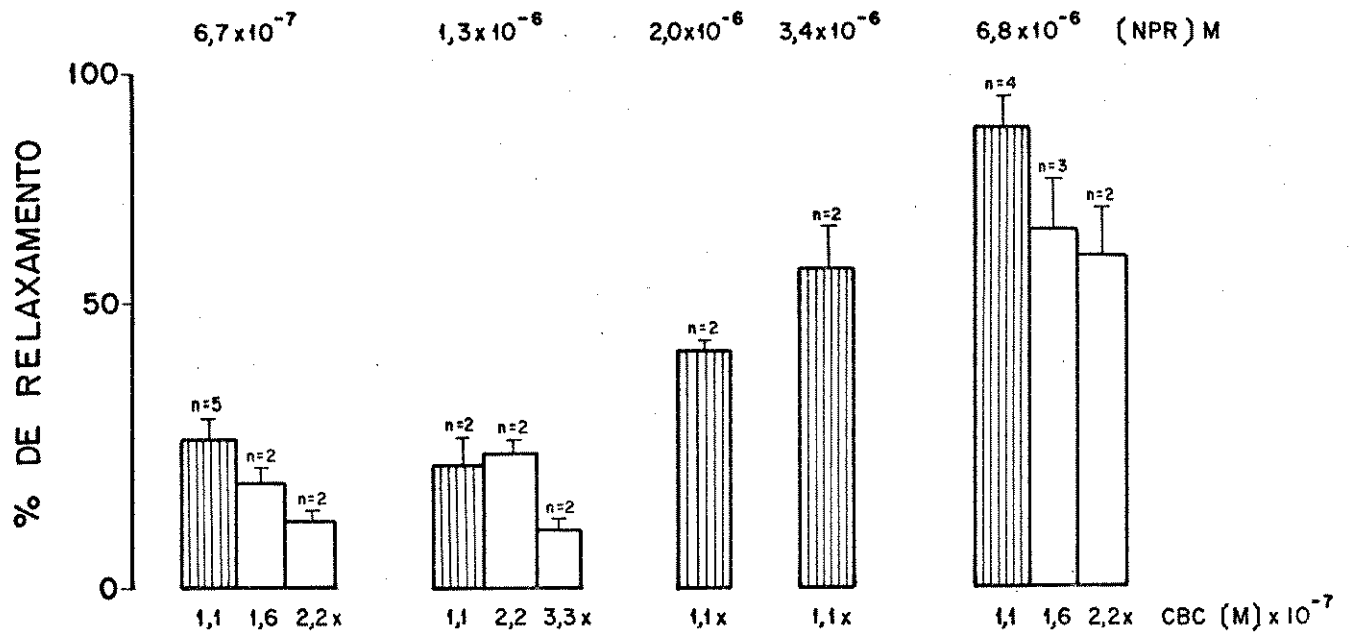


FIG. 11 - Efeito relaxante do NPR, em termos porcentuais, sobre a musculatura traqueal pré-contraída pelo CBC nas concentrações indicadas. Barras tracejadas, apenas para destacar as respostas à concentração de $1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$ de CBC.

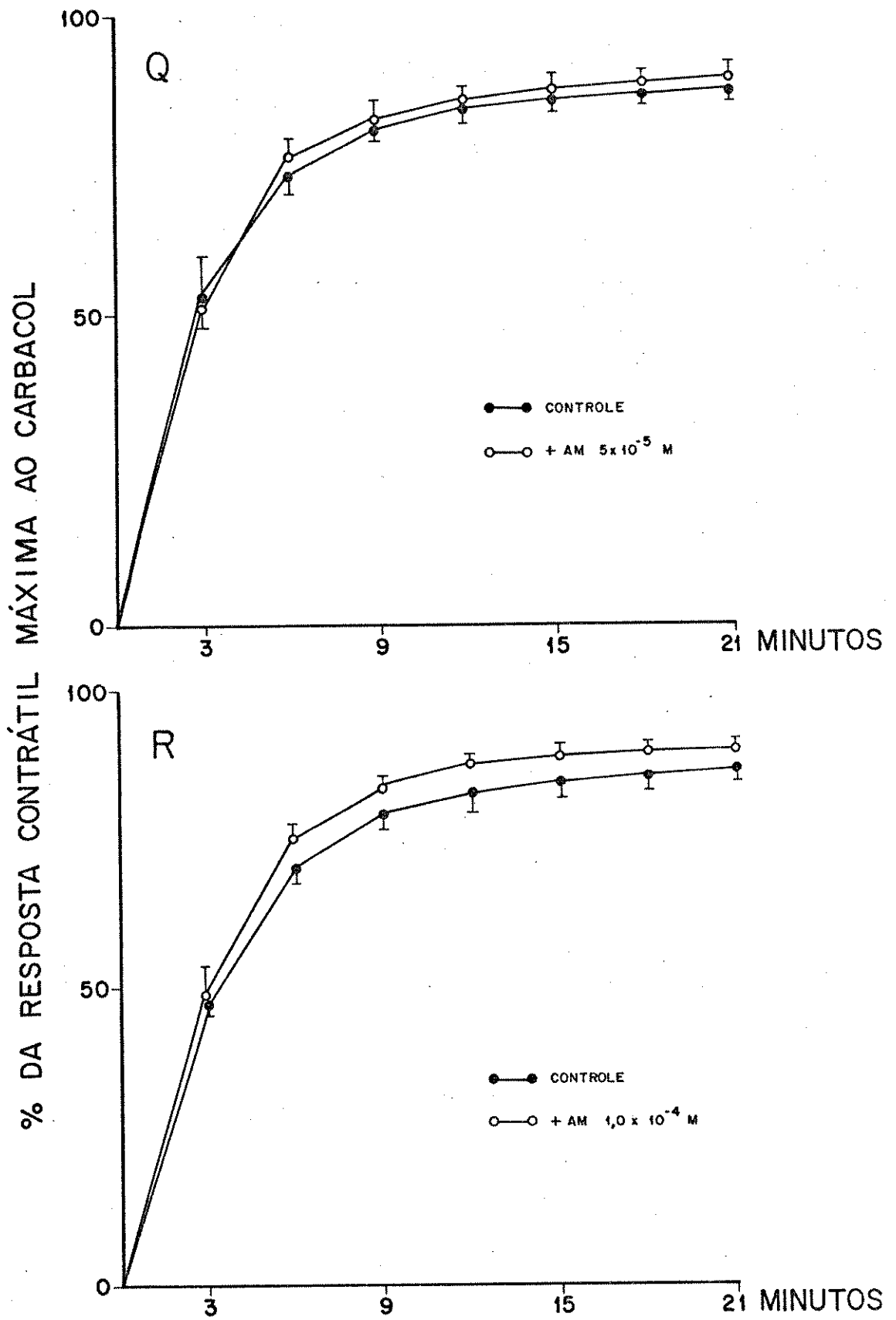


FIG. 12 - Par de cadeias traqueais (Q e R) contraídas pelo CBC ($5,5 \times 10^{-8}$ M), em ausência (●-●) ou em presença (○-○) de azul de metileno (AM) nas concentrações indicadas.

V.2. Sobre o relaxamento pelo NPR: pré-contracção pelo CBC:

Os efeitos de diferentes concentrações de AM no relaxamento induzido pelo NPR ($6,7 \times 10^{-7} M$), em presença de CBC ($1,1 \times 10^{-7} M$), podem ser observados no experimento representado na FIG. 13. Nota-se como a velocidade de contracção ao CBC e o pico atingido se repetiram de maneira semelhante ao longo do experimento, tanto para uma mesma preparação, como entre elas. Em ausência de AM o NPR produz relaxamento parcial de 25 a 30%, nas duas cadeias traqueais. Este relaxamento foi diminuído de 50%, aproximadamente, quando o AM esteve presente em concentração de $5,0 \times 10^{-5} M$, preparação S, curvas 2, 5 e 6. As curvas realizadas após o contato do inibidor com a preparação e sua posterior retirada, curvas 3 e 4, preparação S, não mostraram modificações quer da resposta contrátil ao CBC, quer do relaxamento ao NPR. Na preparação T, o efeito do nitro-composto não se alterou em presença de uma concentração 10 vezes menor de AM. Evidenciando o efeito dose-dependente do corante, o relaxamento diminuiu de 70% com a maior concentração de AM até então estudada ($1,0 \times 10^{-4} M$ - preparação T - curva 5). Mais uma vez, as respostas contráteis e relaxantes obtidas após o tratamento com o AM (curvas 4 e 6) não estavam alteradas em relação ao controle. É interessante ressaltar que novamente o efeito do nitro-composto foi completo após aproximadamente, 5 minutos do seu contato com a musculatura, independente da presença ou não do agente inibidor.

S

1,0 cm [5 min

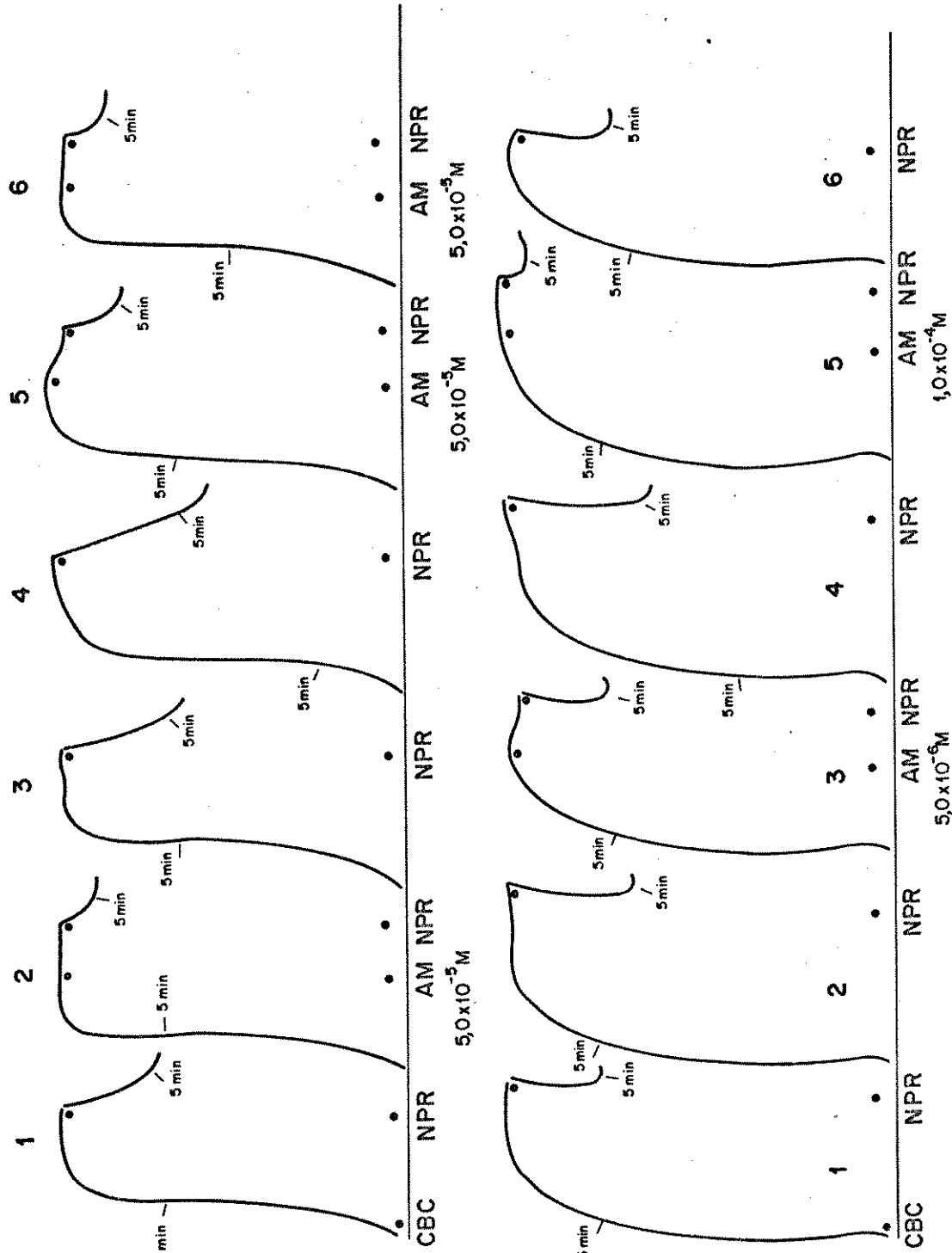


FIG. 13 - Efeito de diferentes concentrações de AM sobre o relaxamento produzido pelo NPR ($6,7 \times 10^{-7} M$), sobre as respostas máximas ao CBC ($1,1 \times 10^{-7} M$). NPR adi

V.3. Sobre as respostas contráteis aos estímulos mecânicos:

Os efeitos do AM sobre as respostas contráteis provocadas através do sistema intrínseco foram observados adicionando-se o inibidor no início do desenvolvimento da contração (FIG. 14) ou depois de atingido o equilíbrio da resposta máxima aos estímulos mecânicos (FIG. 15). Observa-se que ambas preparações apresentam resposta contrátil aos estímulos mecânicos de amplitude normal, com rápido desenvolvimento, curvas 1 - preparações U e V, e que a responsividade da musculatura não se altera ao longo do tempo, curva 2- preparação V, muito embora ocorra uma pequena queda do tono no platô. O AM colocado no início da curva estímulo-resposta, nas concentrações de $5,0 \times 10^{-5} M$ (preparação V, curva 2) ou $10^{-4} M$ (preparação C, curva 3), acelera o desenvolvimento das respostas aos estímulos e provoca um aumento da amplitude em cerca de 12% e 36% respectivamente. Entretanto, retirando-se o AM do banho, as respostas subsequentes apresentaram-se diminuídas de aproximadamente 20 a 25% (curva 3 - preparação U e curva 4 - preparação V). Observa-se que a última curva estimulada também apresentou-se inibida e que a adição de AM ($5 \times 10^{-5} M$ - preparação U ou $10^{-4} M$ - preparação V), estando a musculatura parcialmente contraída, provoca uma resposta contrátil adicional, que se desenvolve por completo em cerca de 25 a 30 minutos, atingindo um nível próximo ou superior ao nível 2 controle (curva 1 - ambas preparações). A figura mostra ainda que o relaxamento pelo IS ($8 \times 10^{-7} M$) não é prejudicado pelo AM nas duas concentrações utilizadas (curvas 2 U e 3 V).

1,0 cm [5 min

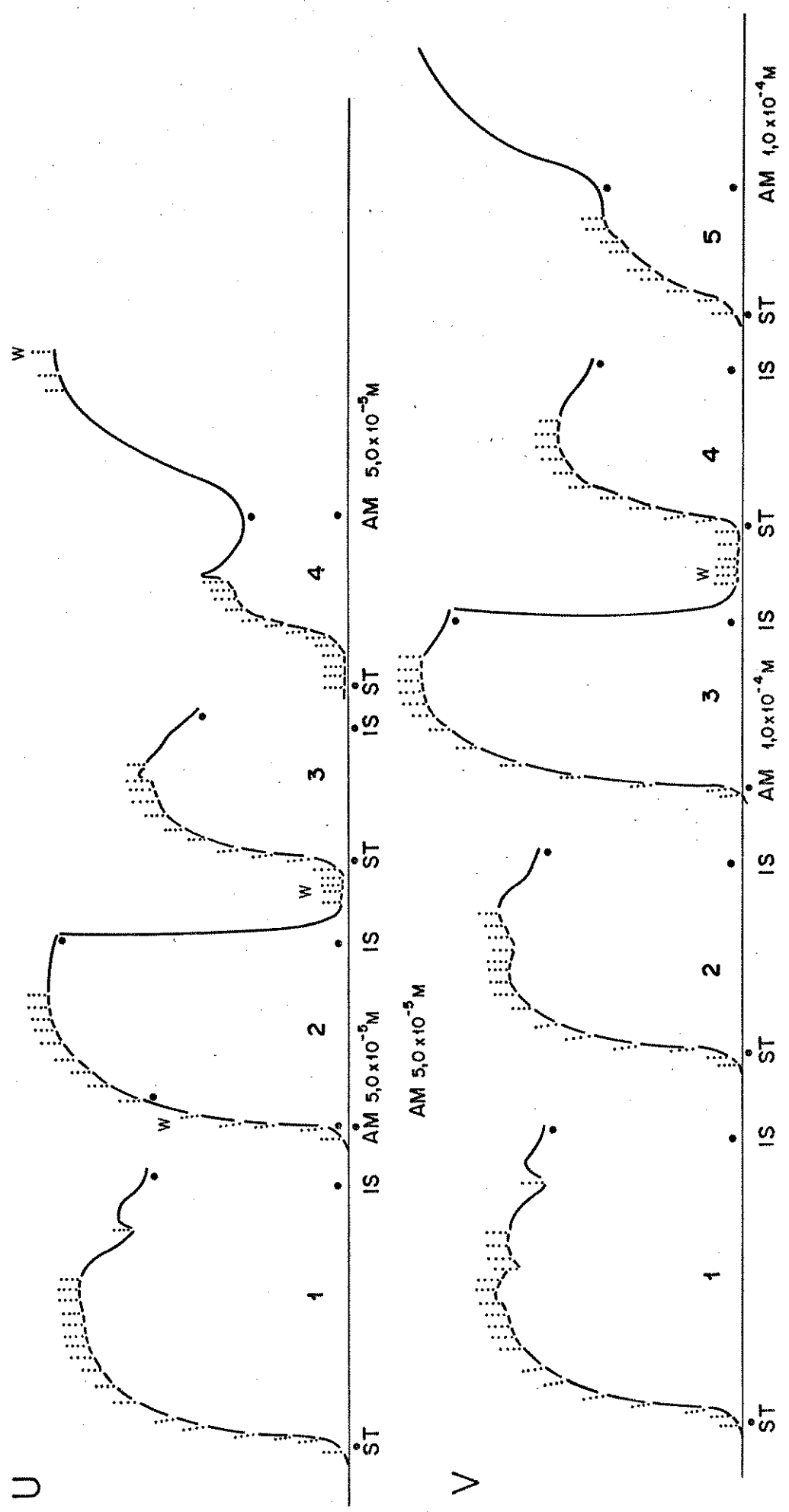


FIG. 14 - Efeitos do AM, nas concentrações de $5,0 \times 10^{-5}M$ (U) ou $1,0 \times 10^{-4}M$ (V), sobre as respostas do músculo liso à estimulação mecânica (ST). Relaxamento indu

Os efeitos do AM, adicionado sobre a preparação contraída pelos estímulos mecânicos podem ser visualizados na FIG. 15. O registro mostra que ambas preparações estavam em condições homogêneas e ideais de funcionamento, quanto à velocidade de resposta, a amplitude máxima atingida pela estimulação, manutenção do tono no nível 2, bem como em relação à repetitividade das curvas 1, 2, 3X e 1, 2Y. O isoproterenol ($8,0 \times 10^{-7} M$) foi utilizado como relaxante em todas as curvas realizadas. Na preparação X observa-se que em presença de AM na concentração de $5 \times 10^{-6} M$ (curva 4), ocorre relaxamento da musculatura, que não atinge o nível zero; as respostas subsequentes (curvas 5,6 e 7) apresentaram-se prejudicadas de maneira reversível, principalmente em relação à manutenção da contração máxima atingida.

Constatamos também, como mostra a FIG.15, que o AM ($5 \times 10^{-5} M$) não altera o efeito contrátil da estimulação mecânica. Após contato com a musculatura por cerca de 25 minutos, o AM foi retirado, a preparação relaxada completamente pelo IS ($8,0 \times 10^{-7} M$), sendo a seguir realizadas cinco curvas por estimulação mecânica (ST). Observa-se, então, que estas respostas estão inibidas, com redução do pico máximo, além de sofrerem significante prejuízo na manutenção do estado de contração atingido. No período de tempo estudado, de aproximadamente 5 horas, não ocorreu recuperação completa do sistema intrínseco, que se manifesta nos registros decrescentes em ausência dos estímulos, no patamar das curvas.

1,0 cm [5 min

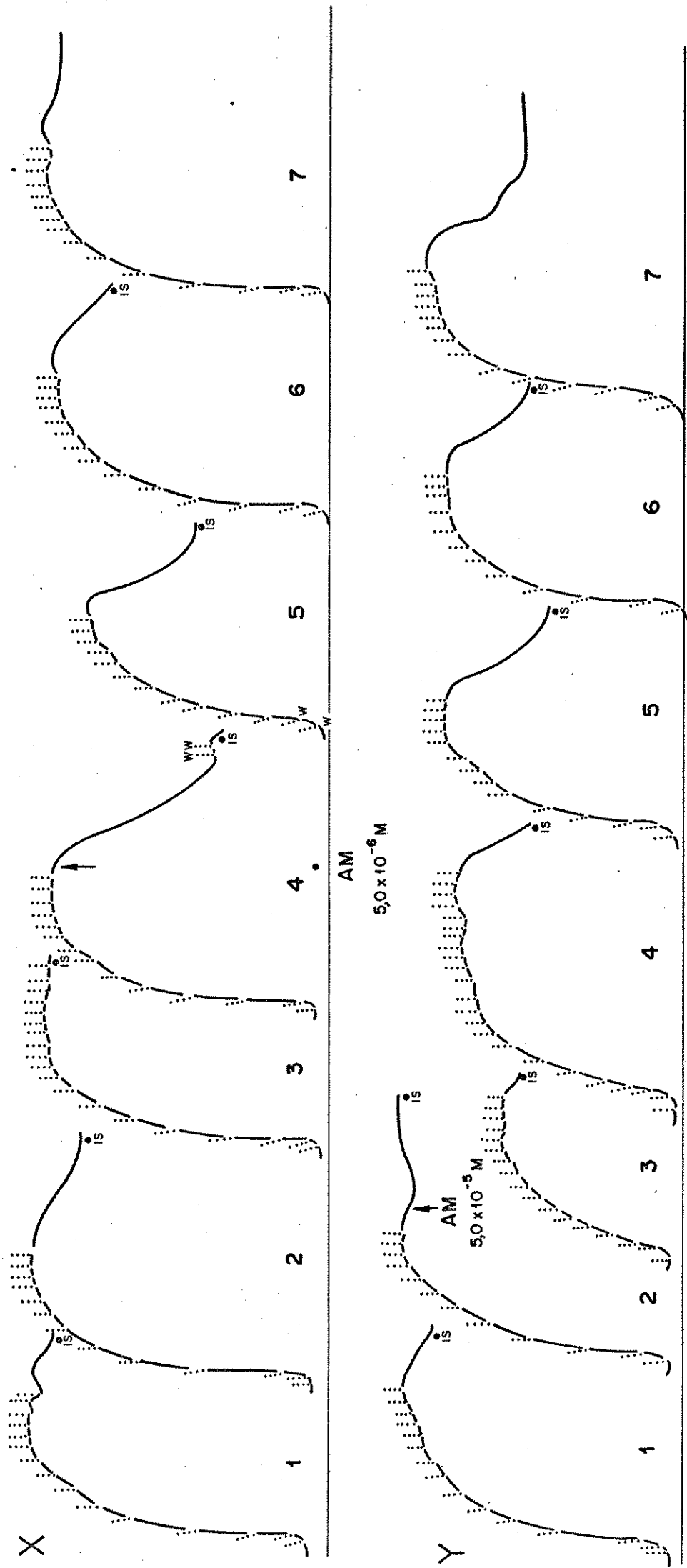


FIG. 15 - Efeitos do AM, $5,0 \times 10^{-5}M$, em Y e $5,0 \times 10^{-6}M$ em X, na manutenção e no desenvolvimento das res postas contráteis aos estímulos mecânicos, de um par de cadeias traqueais. Relaxamento completo pelo IS, $8,0 \times 10^{-7}M$.

V.4. Sobre o relaxamento pelo NPR das contrações provocadas por estimulação mecânica:

O efeito do AM ($5,0 \times 10^{-5} M$) sobre o relaxamento induzido pelo NPR, estando o par de cadeias traqueais contraídas por estímulos mecânicos, está representado na FIG.16 . Pode-se observar que a velocidade de contração aos estímulos mecânicos, bem como a manutenção do tono no platô, concordam com os resultados anteriores. Em ausência do AM , curva 1, o NPR relaxa completamente a musculatura, podendo ser necessária a adição de uma concentração maior do composto para se atingir o nível zero. O AM, colocado no patamar da segunda curva estimulada mecanicamente, não provoca qualquer modificação dessa condição característica da cadeia traqueal. Após 30 minutos de contato com o AM, o NPR não induz relaxamento total, mostrando-se diminuído de 30%, o que demonstra mais uma vez a capacidade inibitória do AM sobre o efeito do nitro-composto, tal como em relação à contração pelo agonista exógeno, (FIG. 13). Após o desaparecimento do efeito desta dose inicial de NPR, segue-se uma pequena resposta contrátil espontânea, que se estabiliza num nível inferior ao do sistema intrínseco. Três adições de nitroprussiato de sódio não mais leva a preparação até o nível zero, salientando repetidamente a profunda inibição do seu efeito. As contrações espontâneas observadas após as adições sucessivas do nitro-composto vão se desvanecendo progressivamente, lembrando uma resposta taquifilática.

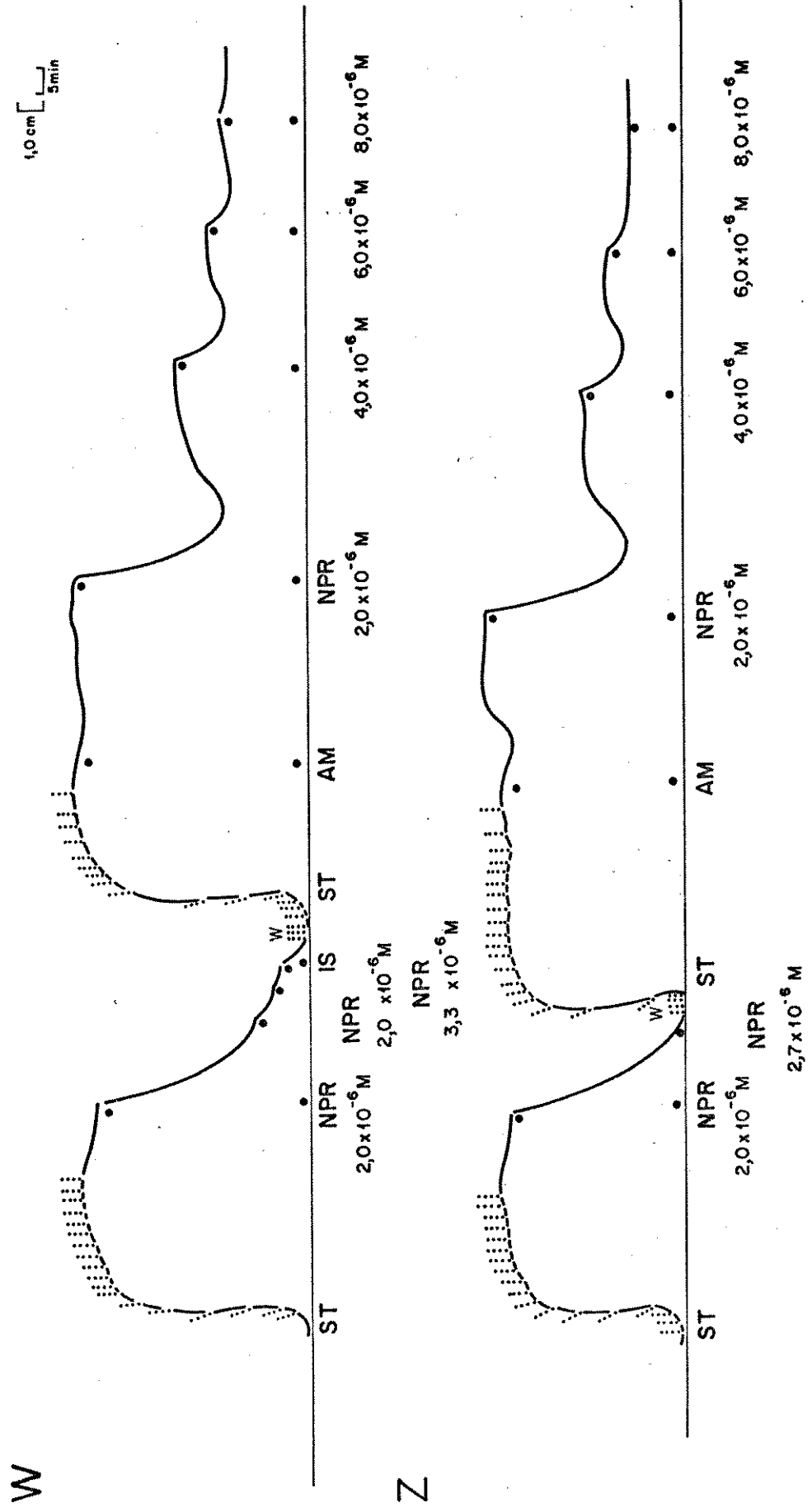
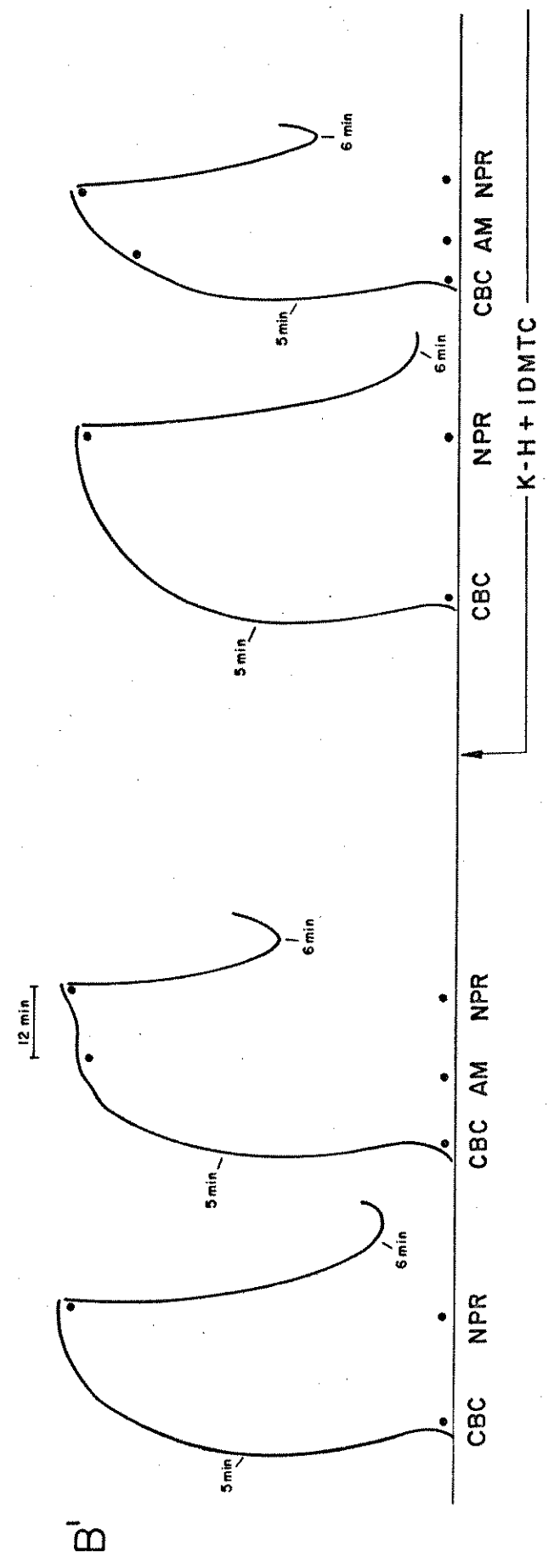
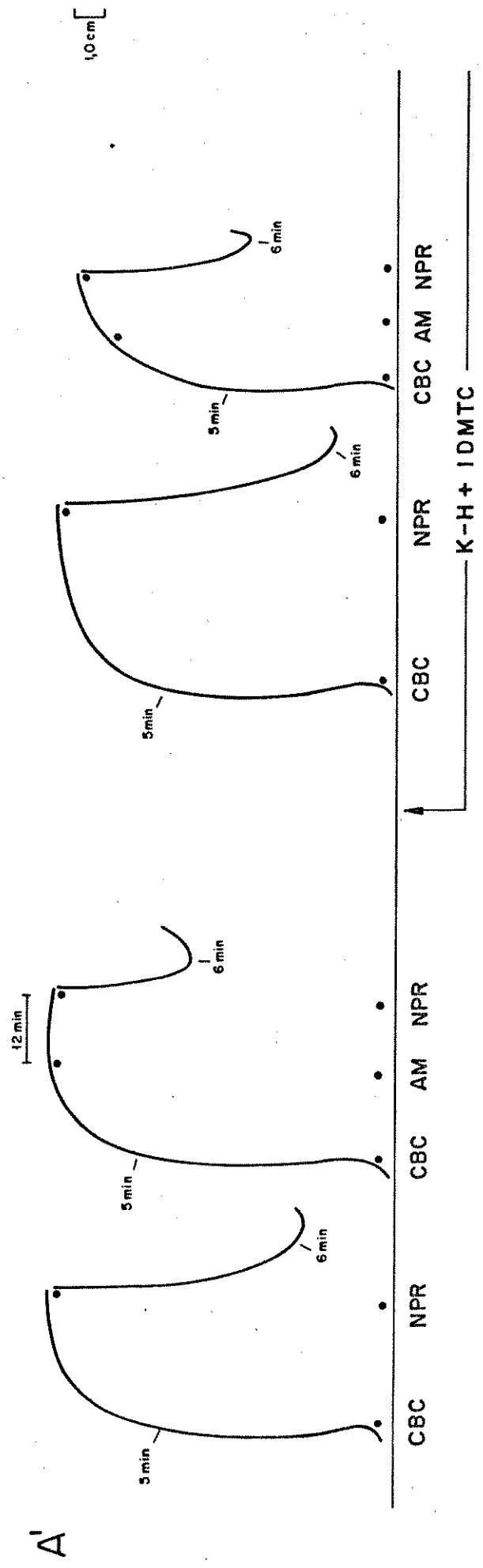


FIG. 16 - Efeitos relaxanetes do NPR em ausência ou em presença do AM ($5,0 \times 10^{-5} M$) em um par de cadeias traqueais (W e Z) pré-contraídas por estímulos mecânicos

VI. EFEITOS DA INDOMETACINA NAS RESPOSTAS AO NPR:

Em ausência de IDMTC o NPR relaxa significativamente (cerca de 76%) a musculatura traqueal contraída pelo CBC ($1,1 \times 10^{-7} \text{M}$) (FIG.17). Após contato com IDMTC ($8,4 \times 10^{-7} \text{M}$) por 95 minutos, a preparação se relaxa até o nível zero e não ocorrem respostas aos estímulos mecânicos (não mostrado). Nestas condições, observa-se poderoso relaxamento de aproximadamente 87% à mesma dose de nitro-composto, enquanto que o AM, na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{M}$, inibiu este efeito relaxante de 30 a 35%, quer em ausência, quer em presença de IDMTC no Krebs.



D I S C U S S Ã O

I) RESPOSTAS CONTRÁTEIS DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL

A produção endógena dos metabólitos do ácido araquidônico pelos tecidos animais e o seu papel modulador das funções biológicas, tem sido verificado não apenas no funcionamento do sistema respiratório (OREHEK e cols., 1975), como também em diversos aspectos da fisiologia da reprodução (GOLDBERG & RAMWELL, 1975), de respostas imunológicas (PELUS & STRAUSSER, 1977), do funcionamento renal (DUNN & HOOD, 1977), vascular (DUSTING; MONCADA & VANE, 1978) e do processo inflamatório (HIGGS; MONCADA & VANE, 1984).

A cadeia traqueal de cobaias "in vitro", mantida em repouso e completamente relaxada, apresenta contração espontânea, cujo desenvolvimento pode ser acelerado por estímulos mecânicos consecutivos (FIGS. 1 e 2). Em condições normais, o tono inerente da cadeia traqueal não se modifica ao longo do tempo; tanto o desenvolvimento da resposta aos estímulos mecânicos, como o nível contrátil atingido se mantêm constantes durante todo o experimento (FIGS. 14 e 15).

Utilizando traquéia intacta de cobaia, isolada em perfusão, COLEMAN & FARMER (1971), observaram que a preparação desenvolvia gradual aumento espontâneo da pressão intraluminal, de natureza até então desconhecida. Posteriormente

te, foi verificado que a indometacina produzia relaxamento dose-dependente da preparação traqueal de cobaia contraída espontaneamente, sugerindo que o tono intrínseco fosse devido à produção de prostaglandinas (FARMER e cols., 1972).

Em nossas condições experimentais, a indometacina produz relaxamento gradual da preparação previamente contraída por estímulos mecânicos (FIGS. 5 e 6), até o nível denominado zero, em cerca de 60 a 80 minutos, que corresponde ao relaxamento máximo de que a preparação é capaz. Estímulos mecânicos realizados durante a progressão do relaxamento (FIG. 6) ou após o seu término (FIG. 5), não mais induzem respostas contráteis na musculatura. Este fato sugere que o tono intrínseco decorre, pelo menos em parte, da produção de prostanóides pelo músculo liso traqueal de cobaias (OREHEK e cols., 1973, 1975; GRODZINSKA e cols., 1975) ou, como sugerem ADCOCK & GARLAND (1980), da participação de metabólitos da via lipo-oxigenase.

Quando a musculatura está contraída pelo carbacol, não se observa o esperado relaxamento completo que se sucede a retirada do agente muscarínico no platô da curva (FIGS. 4 e 6); entretanto, com a inibição do sistema intrínseco pela indometacina, a cadeia traqueal chega prontamente ao nível zero, logo após a remoção do agonista (FIGS. 5 e 6, K-H com indometacina). Isto significa que o tono espontâneo da musculatura traqueal não se manifesta apenas quando o órgão está relaxado ou submetido aos estímulos mecânicos a partir do nível zero. Vários trabalhos demonstram que as respostas contráteis à agonistas muscarínicos ou à outros agentes con

trâteis da traquéia provocam a liberação de prostaglandinas e de outros prostanóides pelo tecido, durante a contração (JONES e cols., 1980; MITCHELL, 1982 e 1984; SHORE e cols., 1985).

Em 1975, OREHEK e cols., demonstraram a liberação de prostaglandinas dos tipos E_2 e F_2 - alfa pela traquéia de cobaias contraída por efeito da acetilcolina ou da histamina. Estas prostaglandinas também eram produzidas quando a superfície mucosa, mas não a serosa do órgão era estimulada mecanicamente pelo roçar delicado de um bastão de vidro. A incubação com indometacina ($1,7 \times 10^{-6}M$), além de reduzir a tensão basal da preparação, diminui as respostas às baixas concentrações de histamina, serotonina, acetilcolina, bário e potássio; as respostas às altas concentrações destes agonistas estavam aumentadas. Em presença de concentração mais elevada de indometacina ($8,5 \times 10^{-5}M$), as respostas a todas as concentrações de histamina estão diminuídas, sendo este efeito prontamente reversível uma vez suprimido o inibidor. Estes autores sugeriram que a tensão basal da traquéia de cobaia era devida à produção de prostaglandina F_2 - alfa e que, durante o desenvolvimento da resposta contrátil aos diferentes agonistas, as prostaglandinas E_2 e F_2 - alfa seriam liberadas com a finalidade de modular a intensidade da contração do músculo. Esta hipótese, que ressalta o papel modulador do sistema intrínseco do músculo traqueal, admite a necessidade fisiológica de se manter o tono muscular num nível constante, compatível com o funcionamento normal deste órgão. De acordo com a intensidade do estímulo contrátil, o sistema se

ria acionado no sentido de intensificar as respostas às pequenas concentrações de agonistas ou de atenuar o efeito de doses elevadas. Tal modulação seria obtida por aumentos ou diminuições nos níveis das prostaglandinas E_2 e F_2 - alfa, ou por alterações na sensibilidade do músculo a estes prostanoídes, individualmente.

Em nossas condições experimentais, as respostas ao carbacol nas menores concentrações utilizadas estão diminuídas em presença de indometacina (FIGS. 5, 6 e 7), e mesmo em sua ausência, depois de ser posta em contato, seguido de sua remoção do banho. Isto indica que o sistema intrínseco da cadeia traqueal aumenta a contração às pequenas concentrações do carbacol ($2,7 \times 10^{-8}M$ e $5,5 \times 10^{-8}M$), o que confirma as observações relatadas por OREHEK e cols. (1975). Assim, estímulos de baixa intensidade acionam o sistema prostaglandinérgico modulador do tono, no sentido de intensificar ou exarcebar as respostas contráteis. A presença deste sistema modulador não permite a execução de curvas dose-efeito nesta preparação. A relação direta entre concentração do agonista muscarínico e o seu efeito, observadas nas figuras 3 e 4, é função mais complexa que usualmente e estaria limitada a valores de resposta ao carbacol superiores ao nível do sistema intrínseco, o qual às vezes superam. Entretanto, a própria amplitude das respostas do sistema prostaglandinérgico varia, atingindo algumas vezes 80% da capacidade contrátil máxima (FIG. 6). Isto dificulta a obtenção de respostas ao carbacol que estejam acima dos níveis do sistema modulador e, ao mesmo tempo, abaixo dos níveis máximos. Mais fre

quentemente, os efeitos de concentrações elevadas de carbacol não se alteraram, estando o sistema intrínseco inibido pela indometacina (FIGS. 6 e 7), e quando se mostraram amentados, essa diferença não foi significativa, o que em parte decorre do tamanho reduzido da amostra trabalhada e da imprecisão intrínseca ã metodologia. A explicação deste fato é complexa, mas envolve principalmente a existência de um "espaço" adequado entre os níveis dois e três, que permita registrar contrações que estejam suficientemente maiores que a resposta intrínseca máxima e, ao mesmo tempo, abaixo da resposta extrínseca máxima, de modo a exibir aumento considerável da contração ao agonista na vigência do bloqueio pela indometacina.

Algumas observações sugerem, contudo, que as contrações de maior intensidade possam ser moduladas pelo sistema intrínseco da cadeia traqueal. A primeira delas se relaciona com os efeitos do carbacol ($2,2 \times 10^{-7}$) em presença de indometacina ($5,6 \times 10^{-7}M$ - FIG. 7); apenas duas respostas apresentaram-se aumentadas em relação ao pico obtido com Krebs normal, para a mesma concentração do agonista. Muito embora estes aumentos não tenham valor estatisticamente significante, eles fornecem indicação biológica de que as respostas aos estímulos de alta intensidade podem estar sendo inibidas pela ação do sistema modulador. A segunda observação baseia-se no fato de que, retirando-se o carbacol no patamar de sua resposta, obterem-se sistematicamente relaxamentos incompletos, de intensidade diretamente proporcional ã dose do agonista utilizada (FIG. 4). Desta forma, ao se re

mover o carbacol do banho, nas concentrações mais altas utilizadas, a preparação atingirá um nível de equilíbrio de relaxamento inferior ao do sistema intrínseco, previamente definido, porém sem chegar até a linha base. Admitimos que a diminuição da amplitude do nível dois seja consequência do predomínio de prostaglandinas relaxantes, ajustado à diminuição de prostaglandinas contráteis, caracterizando assim a modulação das respostas às concentrações elevadas de carbacol. Concordando com os resultados obtidos em presença de indometacina, as respostas às menores doses de carbacol são devidas em grande parte ao sistema intrínseco, visto que suprimido o agonista não ocorre relaxamento da preparação, que praticamente permanece no nível dois (FIG. 4). Assim, fica demonstrado o papel modulador do sistema intrínseco da cadeia traqueal, sem a necessidade de se abolir tal sistema pela indometacina, procedimento utilizado na maioria dos estudos sobre a modulação das respostas contráteis da musculatura respiratória.

Em conclusão, os nossos resultados mostram que a cadeia traqueal de cobaias apresenta tono intrínseco de natureza prostanoideérgica que modula as respostas contráteis ao carbacol. Esta modulação se faz no sentido de intensificar as respostas contráteis de menor amplitude e, provavelmente, frear as contrações mais intensas, conforme sugestão de OREHEK e cols. (1975). Os efeitos exclusivos dos agonistas contráteis sã serã observados se o sistema modulador estiver ausente, inibido por concentrações adequadas de anti-inflamatórios não-esteróides, tal como a indometacina.

Ia) EFEITOS DA INDOMETACINA

Quando se utilizam anti-inflamatórios não esteróides para avaliar a participação das prostaglandinas em eventos biológicos, não se pode desprezar o fato destas drogas possuírem diversas ações sobre outras enzimas, além de inibir a ciclo-oxigenase. Contudo, as concentrações necessárias para alterar o sistema de sintetase de prostaglandinas de modo específico são, asseguradamente, mais baixas do que para as demais ações (FLOWER, 1974). A habilidade da indometacina interferir na participação do íon cálcio em vários processos biológicos, tais como contração muscular e liberação de enzimas lisossomais de leucócitos polimorfonucleares está bem documentada (NORTHOVER, 1971, 1972 e 1977). Contudo, suas influências sobre o cálcio requerem concentrações uma ou duas ordens de grandeza mais elevadas do que as por nós utilizadas como inibidora da biossíntese de prostaglandinas, estabelecida e confirmada anteriormente, que é da ordem de $10^{-7}M$ (SAKAMOTO, 1983). Os efeitos de concentrações elevadas de indometacina são, não apenas inespecíficos, como também caracteristicamente reversíveis (OREHEK e cols., 1975, SHORE e cols., 1985). Assim é que, em presença de indometacina, $8,4 \times 10^{-5}M$ (FIG. 6), as respostas a todas as doses de carbacol apresentaram-se diminuídas. Após a supressão do inibidor do banho, confirmou-se a inespecificidade do seu efeito; as respostas às altas concentrações do carbacol se recuperaram completamente, uma vez que a inibição pela indometacina é reversível e inespecífica. Entretanto, o compo

nente intrínseco é permanentemente inibido, do que resultam respostas não moduladas e de amplitude completa. Assim, as respostas a baixas concentrações do agente muscarínico, produzidas em condições normais pelo componente endógeno prostaglandinérgico, diminuem ou desaparecem com a supressão do sistema intrínseco.

Nos trabalhos em que a indometacina é utilizada para avaliar o papel das prostaglandinas nas respostas contráteis à agonistas exógenos, pouca menção é feita sobre seu mecanismo de ação e a duração do seu efeito. Em nossas condições experimentais, a indometacina sempre foi adicionada à preparação completamente contraída pelos estímulos mecânicos. Este procedimento foi escolhido porque fornece, ao inibir a ciclo-oxigenase, uma pista sobre a intensidade do bloqueio, função que é da velocidade do relaxamento. Também padroniza a atuação de moléculas de ação específica sobre o sistema prostaglandinérgico, sempre que este se encontre no mesmo estado funcional. O relaxamento gradual observado, provavelmente é resultado de diminuição da produção de prostaglandinas, em consequência da inativação progressiva da enzima que metaboliza o ácido araquidônico, precursor destes prostanóides. Alcançado o relaxamento máximo de que o músculo é capaz, atingido após 60 a 80 minutos, a estimulação mecânica intermitente não provoca, a partir de então, respostas contráteis, mostrando que o sistema intrínseco está ausente (FIGS. 5 e 6). Nestas condições, as respostas ao carbacol são certamente exclusivas deste agonista, sem sofrer influências do sistema modulador. Retornando-se ao Krebs-

-Henseleit normal, por meio de sucessivas trocas do líquido, o sistema contrátil intrínseco ainda permanece inibido por um período aproximado de 60 minutos ou mais, dependendo da concentração do inibidor e do tempo de contato prévio com a preparação; nestas condições, o teste do carbacol ainda repete seus efeitos característicos. Contudo, em pelo menos um experimento pudemos verificar que o sistema intrínseco pode se recuperar por completo, mesmo após contato com a indometacina, $8,4 \times 10^{-7}M$ (FIG. 6) por um período de três horas e meia.

Os nossos resultados mostram que a indometacina, empregada numa concentração da ordem de $10^{-7}M$, inibe apenas o sistema intrínseco da cadeia traqueal de cobaias. Esta inibição, aparente após 60 a 80 minutos, é passível de reversão quando se retira o anti-inflamatório do banho, mesmo após longos períodos de seu contato com a musculatura. Desta forma, o conhecimento detalhado do comportamento da preparação frente ao inibidor utilizado, é de importância fundamental para se interpretar corretamente o papel do sistema intrínseco na fisiologia do músculo traqueal.

II) RESPOSTAS RELAXANTES AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO

O nitroprussiato é poderoso agente vasodilatador, cujo mecanismo de ação vem sendo intensamente estudado nos anos recentes (IGNARRO & KADOWITZ, 1985). Da análise dos seus efeitos em diferentes músculos lisos, KREYE e cols.

(1975), observaram potente efeito relaxante, somente nas musculaturas que apresentavam respostas predominantemente tônicas, quais sejam, a aorta de ratos contraída pela nor-epinefrina e a cadeia traqueal de cobaias contraída pelo carbacol. Sugeriram que o nitroprussiato atuava no acoplamento excitação-contração da musculatura lisa tônica, interferindo no influxo e na ativação intracelular do cálcio.

Quando a musculatura traqueal está completamente contraída pelos estímulos mecânicos ou pelas pequenas concentrações de carbacol, que promovem respostas muito próximas do nível do sistema intrínseco, o nitroprussiato tem a habilidade de relaxar completamente a preparação (FIG. 8). Nos resultados também mostram que o efeito do nitroprussiato é dose-dependente (FIGS. 8, 9 e 10) e inversamente proporcional à concentração do agonista, conforme registrado em nossos experimentos (FIG. 11; FIGS. 8, 9 e 10: NPR $6,7 \times 10^{-7}M$) isto é, aumentando-se a concentração do carbacol, os relaxamentos obtidos com uma mesma dose do nitro-composto são gradualmente menores. Este fato também foi relatado por LINCOLN (1983), utilizando a preparação de aorta de rato contraída pela nor-epinefrina. Este autor observou que o grau de relaxamento induzido pelo nitro-composto era mais intenso em presença de baixas concentrações da catecolamina. Seus resultados sugerem a existência de um antagonismo entre o relaxante e o cálcio intracelular mobilizado para a contração. É interessante observar como a intensidade de contração realmente influencia o grau de relaxamento pelo nitroprussiato. Assim, cadeias traqueais que exibem sensibilidades diferentes

ã uma mesma dose de carbacol, são relaxadas em maior ou menor grau, de acordo com a velocidade da sua contração e a amplitude da resposta máxima induzida pelo agonista contrátil; aquelas menos intensas (FIG. 10; NPR $6,7 \times 10^{-7}M$) são relaxadas mais facilmente (FIG. 9; NPR $6,7 \times 10^{-7} M$).

Além de seus efeitos na mobilização do cálcio intracelular e na permeabilidade da membrana do músculo liso vascular ao íon cloro (KREYE, 1980), tem-se verificado que o relaxamento pelo nitroprussiato envolve aumentos dos níveis do GMP-cíclico, tanto no músculo liso vascular (IGNARRO e cols., 1981), como na traquéia de boi (KATSUKI & MURAD, 1977) e de cão (FISCUS e cols., 1984). GRUETTER e cols. (1981a) demonstraram que o azul de metileno inibe, simultaneamente, o acúmulo de GMP-cíclico e o relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio na artéria coronária do boi. Discordamos, entretanto, da interpretação dada por estes autores nos resultados de JANIS & DIAMOND (1979), em relação aos mecanismos envolvidos no relaxamento de músculos lisos de origem não-vascular. Para nós, as conclusões de JANIS & DIAMOND (1979), não são incompatíveis com o estabelecimento de relação causal entre aumento da concentração de GMP-cíclico e relaxamento da musculatura traqueal, defendida por exemplo, por KATSUKI & MURAD, 1977 e FISCUS e cols., 1984.

Na musculatura lisa da traquéia de cobaias, demonstramos que o azul de metileno, $5,0 \times 10^{-5}M$, diminui o relaxamento pelo nitroprussiato de sódio, $2,0 \times 10^{-6}M$, quando a preparação está contraída por estímulos mecânicos (FIG. 16), ou pelo carbacol (FIG. 13), condição em que o azul de

metileno, $5,0 \times 10^{-5}M$ e $1,0 \times 10^{-4}M$, também inibe o relaxamento pelo nitroprussiato de modo dose-dependente. Resultados semelhantes foram recentemente relatados por ALLEN e cols. (1986b), que também observaram inibição pelo azul de metileno do efeito relaxante do nitroprussiato na traquéia isolada de cobaia contraída pela histamina. A inibição pelo azul de metileno sugere que o nitroprussiato relaxa o músculo liso traqueal através de mecanismos semelhantes aos que operam no músculo liso vascular, pelo menos em relação à ativação da guanil-ciclase, uma vez que o inibidor parece exercer seu efeito de modo específico sobre um componente da molécula da enzima (MARTIN e cols., 1985).

Reverendo o papel do GMP-cíclico no relaxamento do músculo liso vascular, IGNARRO & KADOWITZ (1985) sugerem o emprego da expressão "nitrogen oxide-containing vasodilators" para designar os agentes hipotensores que liberam óxido nítrico da molécula, fator comum envolvido na ativação da guanil-ciclase por todos relaxantes desta classe. O óxido nítrico é bastante lipossolúvel e instável, o que explicaria, segundo NEEDLEMAN e cols. (1985), porque algumas destas drogas exibem efeito hipotensor transitório.

Pudemos observar que o músculo liso traqueal ativado pelo carbacol, e sob condição de relaxamento parcial induzido pelo nitroprussiato de sódio, também mostra nítida tendência a retomar uma contração "espontânea", apesar da virtual presença do relaxante (FIG. 17). Assim, o esgotamento gradual do óxido nítrico, quimicamente instável, em contraste com a conhecida estabilidade estrutural do carbacol

(TAYLOR, 1985), suportam firmemente a hipótese de que o sistema em que agonista e antagonista estiveram presentes tende a retornar espontaneamente ao estado de contração. Este efeito relaxante transitório não poderia ser devido à inativação precoce da droga pela luz ambiente, já que as soluções foram feitas no momento de sua utilização, sendo mantidas em frasco âmbar recoberto por uma fita de plástico negro. Além disso esta hipótese parece pouco provável, face às afirmativas de ARNOLD e cols. (1984) após demonstração de que o nitroprussiato em solução aquosa, quer intacto, quer degradado por meio de radiação eletromagnética de diferentes comprimentos de onda, produz as mesmas respostas hipotensoras e que o óxido nítrico, responsável por seu efeito hipotensor, pode ser quimicamente detectado em solução, após a degradação da molécula original.

NEEDLEMAN e cols. (1973) sugeriram que o relaxamento do músculo liso vascular pelos nitroso-compostos depende de grupos SH teciduais intactos; o exaurimento destes grupos por reagentes químicos específicos causa diminuição do efeito relaxante, o que explicaria a eventual tolerância a estas drogas. Não conseguimos demonstrar a existência ou desenvolvimento de tolerância à repetidas adições de nitroprussiato, no músculo liso traqueal "in vitro" (FIG. 10). Os relaxamentos obtidos com a concentração de $6,7 \times 10^{-7}M$, de intensidade aparentemente variável, progridem sô até valores de resposta muito próximos do nível do sistema intrínseco modulador do tono (FIG. 10, N). Por outro lado, os relaxamentos obtidos com concentrações de $6,7 \times 10^{-6}M$ (FIG. 10, M) fo

foram sistematicamente máximos, isto é, até o nível zero, fora do alcance funcional do sistema modulador endógeno. Se o relaxamento da cadeia traqueal pelo nitroprussiato depende de grupos -SH intactos, tal como no músculo liso vascular, (NEEDLEMAN e cols., 1973; IGNARRO & KADOWITZ, 1985), nossos resultados poderiam indicar que tais grupamentos não se modificam nas condições altamente padronizadas do experimento, no sentido de que a exigência de preparações que exibiram atividade considerável do sistema endógeno modulador do tono, reflita condição metabólica ótima. Convém lembrar que numerosas vezes surpreendemos animais com reações inflamatórias pulmonares, cujas traquéias deram origem a preparações incapazes de gerar tono quer espontâneo, quer resposta contrátil significativa e sustentada a estímulos mecânicos.

III) RESPOSTAS AO AZUL DE METILENO

Nos estudos "in vitro" com preparações de musculatura lisa, o azul de metileno tem sido modernamente experimentado como inibidor da guanil-ciclase. Este composto, que tem ação germicida fraca, foi, no passado, utilizado para induzir a formação de metahemoglobina no tratamento da intoxicação pelo cianeto. Em altas concentrações converte o Fe^{2+} da hemoglobina reduzida a Fe^{3+} , do que resulta produção de meta-hemoglobina, tal como faz o ânion nitrito. Contrariamente, baixas concentrações do azul de metileno "in vivo" apressam a conversão da meta-hemoglobina a hemoglobina, o

que ocorre no interior de hemácias, numa reação catalisada por redutases da meta-hemoglobina, dependentes de NADP. Aqui, o azul de metileno atua como acceptor de elétrons do NADH para a meta-hemoglobina; uma vez reduzido pelo NADH, passa à forma leuco, reduzindo então a meta-hemoglobina (HARVEY, 1975).

A falta de informação mais específica quanto a ações do azul de metileno sobre a musculatura lisa respiratória nos levou a executar experimentos no sentido de constatar e medir eventuais efeitos quer sobre o sistema intrínseco modulador do tono, quer sobre as respostas ao agonista exógeno carbacol.

Nossos resultados mostram que o azul de metileno não altera as respostas contráteis ao carbacol, $5,5 \times 10^{-8}M$, quer em relação a velocidade, quer em relação à amplitude (FIG. 12). Quando a musculatura traqueal está sob o comando do mecanismo endógeno modulador do tono, o azul de metileno apresenta efeito duplo sobre a preparação. Se adicionado sobre a musculatura traqueal no estado de relaxamento, as respostas aos estímulos mecânicos são aceleradas e atingem maior amplitude (FIG. 14; AM - $5,0 \times 10^{-5}M$ ou $1,0 \times 10^{-4}M$). Entretanto, se adicionado à preparação sob contração máxima por efeito do sistema endógeno (FIG. 15), provoca relaxamento parcial da musculatura (AM - $5,0 \times 10^{-6}M$ - X), ou o nível da resposta contrátil não se modifica (AM - $5,0 \times 10^{-5}M$ - Y). Efeitos relaxantes apareceriam com concentrações menores, mas não com concentrações dez vezes maiores, e poderiam estar ligados à predominância da ação redutora do azul de meti

leno sobre algum metabólito endógeno. Tal como descrito para as ações do próprio azul de metileno sobre a hemoglobina, quando em altas concentrações ele facilita a oxidação do Fe^{2+} formando meta-hemoglobina, porém fazendo efeito oposto, isto é, promovendo a redução da meta-hemoglobina, quando em baixas concentrações (HARVEY, 1975). Inicia-se, então, um processo lento, caracterizado pela inibição da eficiência reacional do sistema intrínseco (FIGS. 14 e 15). Essa inibição, tanto da amplitude como da capacidade de manutenção das respostas aos estímulos mecânicos, é essencialmente dose-dependente e sua reversibilidade só ocorre para concentrações menores que $5,0 \times 10^{-6}\text{M}$. Para concentrações assim baixas, o sistema intrínseco se mostra sensível, enquanto que o relaxamento pelo nitroprussiato não se revela inibido (Curva 3, FIG. 13T).

Em nossas condições experimentais, o azul de metileno provoca contração da musculatura traqueal, que não ultrapassa o nível atingido pelos estímulos mecânicos (FIG. 14). MARTIN e cols. (1985), observaram que o azul de metileno, após pequeno período de latência, produz contração lenta de anéis aórticos isolados de coelhos, que decorreria da liberação de nor-epinefrina das terminações nervosas intramurais, já que o pré-tratamento dos animais com reserpina previne o efeito contrátil. Entretanto, a observação experimental feita pelos mesmos autores de que até nas preparações obtidas de animais pré-tratados pela reserpina permanece um efeito facilitador das contrações provocadas pelo agonista alfa-adrenérgico fenilefrina, deixa claro que o azul de metileno tem realmente pelo menos uma ação farmacológica adicio

nal, nesse nível de concentração, permitindo-se afirmar que o corante é, mais provavelmente, fármaco de atuação intracelular, influenciando processos metabólicos, sem características de um agonista no sentido estrito sobre receptores de membrana.

CRAVEN & DERUBERTIS (1978), demonstraram que a capacidade da guanil-ciclase solúvel de hepatócitos ser ativada por nitro-compostos é perdida durante o processo de purificação, mas pode ser restaurada pela adição da fração sobrenadante, que contém fatores solúveis termo-estáveis. A mesma ativação pelo nitroprussiato, nitritos e pelo óxido nítrico é marcadamente aumentada pela presença de agentes redutores como o ascorbato, cisteína e glutatión, que mantêm o ferro heme na forma ferrosa, o que favorece a formação de complexos nitrosil-heme paramagnéticos pelos ativadores. Realmente, acredita-se que o corante inibe o relaxamento induzido pelos nitrovasodilatadores por oxidar um componente da guanil-ciclase, provavelmente o grupamento heme desta enzima (MARTIN e cols., 1985). Neste contexto, lembramos que a enzima que catalisa a formação da prostaglandina G requer grupamento heme como cofator (MONCADA; FLOWER & VANE, 1985). Desse modo, o azul de metileno poderia encontrar ali um "locus" de ação, do qual viria a prejudicar a formação desta prostaglandina primária e de seus subprodutos, comprometendo desta forma o sistema intrínseco modulador do tono do músculo traqueal.

Assim, o azul de metileno não modifica as respostas contráteis ao carbacol, ao mesmo tempo em que estimula,

ele próprio, o sistema intrínseco até um nível ligeiramente superior ao da suposta resposta máxima endógena e reduz significativamente a eficiência das contrações à estimulação mecânica. Este efeito inibitório sobre o sistema intrínseco é duplo, isto é, se faz sentir tanto na diminuição da amplitude, como através da incapacidade da preparação manter o tono ativo já com baixas concentrações do composto ($5,0 \times 10^{-6}M$), com as quais se observa regeneração completa desses dois parâmetros. A eliminação do tono ativo pela indometacina não modifica o antagonismo fisiológico entre nitroprussiato e carbacol, desde que as suas concentrações se limitem ao bloqueio específico da ciclo-oxigenase. Também os efeitos do azul de metileno reduzindo os relaxamentos provocados pelo nitroprussiato não são afetados pela indometacina.

Na medida em que se aceita como relativamente específica a ação do azul de metileno no bloqueio da ativação da guanil-ciclase pelo óxido nítrico, pode-se concordar que os resultados por nós obtidos são compatíveis com o mesmo mecanismo proposto para a ação relaxante do nitroprussiato de sódio envolvido na musculatura lisa vascular (IGNARRO & KADOWITZ, 1985).

CONCLUSÕES

1. A modulação endógena das respostas ao agonista exógeno carbacol foi demonstrada, não apenas pelo uso de inibição específica, como também sem inibidor da ciclooxigenase, em condições isotônicas que revelam o tono intrínseco da cadeia traqueal.

2. Na musculatura lisa traqueal, as respostas relaxantes ao nitroprussiato de sódio são inibidas pelo azul de metileno, tanto em presença como em ausência do sistema intrínseco, sugerindo que os mecanismos envolvidos no relaxamento da musculatura respiratória pelo nitrocomposto são análogos aos já descritos no músculo liso vascular.

3. O azul de metileno não altera as respostas contráteis ao carbacol, mas as contrações aos estímulos mecânicos estão inibidas.

Esses resultados são compatíveis com a hipótese de que haja um componente comum a ambos sistemas em que o grupo heme esteja implicado na ativação da guanil-ciclase e também essencial na catálise da reação de produção de prostaglandina G.

S U M M A R Y

The "in vitro" analysis of the guinea pig tracheal smooth muscle behavior has revealed that its responses to the action of agonists is modulated by endogenously produced prostaglandins (OREHEK et al., 1975). In our experimental conditions, the isotonic contractions after intermittent standard mechanical stimulation cannot be abolished by simple washings of the preparation. Contrarywise, the contractile responses are cumulative until a well defined level of contraction is reached. If at any point the muscarinic agonist carbachol is added to the preparation, a higher, or even the maximum level of contraction can be attained. If carbachol is removed from the organ bath, only partial relaxation can be achieved, to a level similar to that of the mechanically stimulated preparation. Complete relaxation can be afforded by actively stimulating beta adrenergic receptors, or, for example, by sodium nitroprusside. The responses to high concentrations of carbachol are modulated physiologically, a process that can be prevented by treating the preparation with the nonsteroid anti-inflammatory agent indomethacin. The pharmacological effects of nitroprusside and methylene blue on this preparation were studied in the search for analogous actions as those exerted by these agents, alone or combined, in the vascular smooth muscle. The physiological antagonism between carbachol and nitroprusside is dose-dependent but tachyphylaxis to the repetitive challenging with nitroprusside could not be demonstrated. Methylene blue, proposed as an inhibitor of the activation of guanylate-cyclase by nitric oxide, the intermediary active component of sodium nitroprusside, has additional inhibitory properties on the intrinsic system that modulates the tonus of the guinea pig tracheal muscle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADCOCK, J.J. & GARLAND, L.G. (1980). A possible role for lipoygenase products as regulators of airway smooth muscle reactivity. Br. J. Pharmacol. 69: 167-169.
- AHMED, F.; FOSTER, R.W.; SMALL, R.C. & WESTON, A.H. (1984). Some features of the spasmogenic actions of acetylcholine and histamine in guinea-pig isolated trachealis. Br. J. Pharmacol. 83: 227-233.
- ALLEN, S.L.; BEECH, D.J.; FOSTER, R.W.; MORGAN, G.P. & SMALL, R.C. (1985). Electrophysiological and other aspects of the relaxant action of isoprenaline in guinea-pig isolated trachealis. Br. J. Pharmacol. 86: 843-854.
- ALLEN, S.L.; CORTIJO, J.; FOSTER, R.W.; MORGAN, G.P.; SMALL, R.C. & WESTON, A.H. (1986a). Mechanical and electrical aspects of the relaxant action of aminophylline in guinea-pig isolated trachealis. Br. J. Pharmacol. 88: 473-483.
- ALLEN, S.L.; FOSTER, R.W.; MORGAN, G.P. & SMALL, R.C. (1986b). The relaxant action of nicorandil in guinea-pig isolated trachealis. Br. J. Pharmacol. 87: 117-127.
- ANDERSON, W.H.; KRZANOWSKI, J.J.; POLSON, J.B. & SZENTIVANYI, A. (1979). Characteristics of histamine tachyphylaxis in canine tracheal smooth muscle. Naunyn-Schmiedeberg's

Arch. Pharmacol. 308: 117-125.

- ARNOLD, W.P.; LONGNECKER, D.E. & EPSTEIN, R.M. (1984).
Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic
activity and cyanid release. Anesthesiology, 61: 254-260.
- BABA, K.; SATAKE, T.; TAKAGI, K. & TOMITA, T. (1986).
Effects of verapamil on the response of the guinea-pig
tracheal muscle to carbachol. Br. J. Pharmacol. 88: 441-
449.
- BARNES, P.J.; DOLLERY, C.T. & MACDERMOT, J. (1980). Increased
pulmonary α -adrenergic and reduced β -adrenergic
receptors in experimental asthma. Nature. 285: 569-571.
- BENGTSSON, B.; KHAN, A.R. & WEIBER, R. (1985). Role of
different calcium pools in the contraction of respiratory
smooth muscle. Acta. Physiol. Scand. 124: 93-98.
- BERTELLI, A.; BIANCHI, C. & BEANI, L. (1973). Interaction
between β -adrenergic stimulant and phosphodiesterase
inhibiting drugs on the bronchial muscle. Experientia,
29: 300-302.
- BRINK, C.; DUNCAN, P.G. & DOUGLAS, J.S. (1981). Histamine
endogenous prostaglandins and cyclic nucleotides in the
regulation of airway muscle responses in the guinea-pig.
Prostaglandins, 22: 729-738.
- COLEMAN, R.A. & FARMER, J.B. (1971). The inducement of tone
and its inhibition in isolated tracheal muscle. J. Pharm.

Pharmacol. 23: 220-222.

- CRAVEN, P.A. & DE RUBERTIS, F.R. (1978). Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. J. Biol. Chem. 253: 8433-8443.
- CREESE, B.R. & DENBOROUGH, M.A. (1980). The effect of histamine on cyclic AMP levels in guinea-pig tracheal smooth muscle. Eur. J. Pharmacol. 66: 95-101.
- DAMIANO, M.A. & BARBIERI, E.J. (1985). The release of slow-reacting substance of anaphylaxis from guinea-pig lung: effects of calcium antagonists. Can. J. Physiol. Pharmacol. 63: 23-29.
- DAYA, S. & JOUBERT, P.H. (1986). The interaction between nifedipine and isoprenaline in isolated guinea-pig tracheal muscle pre-contracted with methacholine. Arch. int. Pharmacodyn. 280: 53-57.
- DOUGLAS, J.S.; DUNCAN, P.G. & MUKHOPADHYAY, A. (1984). The antagonism of histamine-induced tracheal and bronchial muscle contraction by diphenhydramine: effect of maturation. Br. J. Pharmacol. 83: 697-705.
- DUNCAN, P.G.; BRINK, C.; ADOLPHSON, R.L. & DOUGLAS, J.S. (1980). Cyclic nucleotides and contraction/relaxation in airway muscle: H₁ and H₂ agonists and antagonists. J. Pharmacol. Exp. Ther. 215: 434-442.

- DUNCAN, P.G.; BRINK, C. & DOUGLAS, J.S. (1982). β -receptors during aging in respiratory tissues. Eur. J. Pharmacol. 78: 45-52.
- DUNCAN, P.G. & DOUGLAS, J.S. (1984). Sensitivity and responsiveness of tracheal and bronchial tissues from young and old guinea-pigs: effect of calcium antagonists. J. Pharmacol. Exp. Ther. 228: 612-619.
- DUNCAN, P.G. & DOUGLAS, J.S. (1985). Age-related changes in guinea-pig respiratory tissues: considerations for assessment of bronchodilators. Eur. J. Pharmacol. 108: 39-48.
- DUNN, M.J. & HOOD, V.L. (1977). Prostaglandins in the kidney. Am. J. Physiol. 233: F169-F184.
- DUSTING, G.J.; MONCADA, S. & VANE, J.R. (1978). Vascular actions of arachidonic acid and its metabolites in the perfused mesenteric and femoral beds of the dog. Eur. J. Pharmacol. 49: 65-72.
- ENGELS, F.; OOSTING, R.S. & NIJKAMP, F.P. (1985). Pulmonary macrophages induce deterioration of guinea-pig tracheal β -adrenergic function through release of oxygen radicals. Eur. J. Pharmacol. 111: 143-144.
- FARMER, J.B.; FARRAR, D.G. & WILSON, J. (1972). The effect of indomethacin on the tracheal smooth muscle of the guinea-pig. Br. J. Pharmacol. 46: 536P-537P.

- FISCUS, R.R.; TORPHY, T.J. & MAYER, S.E. (1984). Cyclic-GMP dependent protein kinase activation in canine tracheal smooth muscle by methacholine and sodium nitroprusside. Biochim. Biophys. Acta. 805: 382-392.
- FLOWER, R.J. (1974). Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. Pharmacol. Rev. 26: 33-67.
- FOSTER, R.W. (1960). The paired tracheal chain preparation. J. Pharm. Pharmac. 12: 189-191.
- FOSTER, R.W. (1966). The nature of the adrenergic receptors of the trachea of the guinea-pig. J. Pharm. Pharmac. 18: 1-12.
- GOLDBERG, V.J. & RAMWELL, P.W. (1975). Role of prostaglandins in reproduction. Physiol. Rev. 55: 325-351.
- GRAY, H. (1979). Sistema Respiratório. In: Anatomia. WARWICK & WILLIAMS ed. 35^a edição - Guanabara-Koogan, R.J. Capítulo 8.
- GRODZINSKA, L.; PANCZENKO, B. & GRYGLEWSKI, R.J. (1975). Generation of prostaglandin E-like material by the guinea-pig trachea contracted by histamine. J. Pharm. Pharmacol. 27: 88-91.
- GRUETTER, C.A.; GRUETTER, D.Y.; LYON, J.E.; KADOWITZ, P.J. & IGNARRO, L.J. (1981a). Relationship between cyclic guanosine 3', 5' - monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of

methylene blue and methemoglobin. J. Pharmac. Exp. Ther. 219: 181-186.

GRUETTER, C.A.; KADOWITZ, P.J. & IGNARRO, L.J. (1981b):

Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite and amyl nitrite. Can. J. Physiol. Pharmacol. 59: 150-156.

HARVEY, S.C. (1975). Antiseptics and disinfectants;

fungicides; ectoparasiticides. In: "The Pharmacological basis of therapeutics". GOODMAN & GILMAN ed. 5th ed., The Macmillan Publ. Co., New York. p. 1003-1004.

HASHIMOTO, T.; HIRATA, M. & ITO, Y. (1985). A role for

inositol 1, 4, 5-triphosphate in the initiation of agonist induced contractions of dog tracheal smooth muscle. Br. J. Pharmacol. 86: 191-199.

HIGGS, G.A.; MONCADA, S. & VANE, J.R. (1984). Eicosanoids in inflammation. Ann. Clin. Res. 16: 287-299.

HOFFMAN, B.B. & LEFKOWITZ, R.J. (1980). Radioligand binding studies of adrenergic receptors: new insights into molecular and physiological regulation. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 581-608.

IGNARRO, L.J. & GRUETTER, C.A. (1980). Requirement of

thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: Possible involvement of S-nitrosothiols. Biochim. Biophys.

Acta. 631: 221-231.

IGNARRO, L.J.; LIPPTON, H.L.; EDWARDS, J.C.; BARICOS, W.H.; HYMAN, A.L. et al. (1981). Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 218: 739-749.

IGNARRO, L.J. & KADOWITZ, P.J. (1985). The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25: 171-191.

IRVINE, R.F. (1982). How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? Biochem. J. 204: 3-16.

ITO, M.; BABA, K.; TAKAGI, K.; SATAKE, T. & TOMIKA, T. (1985). Some properties of calcium-induced contraction in the isolated human and guinea-pig tracheal smooth muscle. Respir. Physiol. 59: 143-153.

JANIS, R.A. & DIAMOND, J. (1979). Relationship between cyclic nucleotide levels and drug-induced relaxation of smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 211: 480-484

JONES, T.R.; HAMILTON, J.T. & LEFCOE, N.M. (1980). Pharmacological modulation of cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea *in vitro*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 58: 810-822.

- KALLŌS, P. & KALLŌS, L. (1984). Experimental asthma in guinea-pigs revisited. Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 73: 77-85.
- KATSUKI, S. & MURAD, F. (1977). Regulation of adenosine-cyclic-3', 5' - monophosphate and guanosine-cyclic-3', 5' - monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. Mol. Pharmacol. 13: 330-341.
- KELNER, M.J. & ALEXANDER, N.M. (1985). Methylene blue directly oxidizes glutathione without the intermediate formation of hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 260: 15168-15171.
- KREYE, V.A.W.; BARON, G.D.; LÜTH, J.B. & SCHMIDT-GAUK, H. (1975). Mode of action of sodium nitroprusside on vascular smooth muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288: 381-402.
- KREYE, V.A.W. (1980). Sodium nitroprusside: approaches towards the elucidation of its mode of action. TIPS 1: 384-388.
- KUEHL, F.A. Jr. (1974). Prostaglandins, cyclic nucleotides and cell function. Prostaglandins 5: 325-340.
- LEFF, A.R.; TALLEY, J.; MUNOZ, N.M. & SHOULBERG, N. (1986). Physiological antagonism caused by adrenergic stimulation of canine tracheal muscle. J. Appl. Physiol. 60: 216-224.

- LEFKOWITZ, R.J.; CARON, M.G.; MICHEL, T. & STADEL, J.M.
(1982). Mechanisms of hormone receptor-effector coupling: the β -adrenergic receptor and adenylate cyclase. Fed. Proc. 41: 2664-2670.
- LINCOLN, T.M. (1983). Effects of nitroprusside and 8-bromo-cyclic-GMP on the contractile activity of the rat aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther. 224: 100-107.
- MARTIN, W.; VILLANI, G.M.; JOTHIANANDAN, D. & FURCHGOTT, R. F. (1985). Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 708-716.
- MACCAIG, D.J. (1986). Autonomic responses of the isolated, innervated trachea of the guinea-pig: interaction with autonomic drugs, histamine and 5-hydroxytryptamine. Br. J. Pharmacol. 88: 239-248.
- MITCHELL, H.W. (1982). The effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on drug-induced contractions in isolated tracheal smooth muscle of the pig. Br. J. Pharmacol. 75: 129-136.
- MITCHELL, H.W. (1984). Pharmacological studies into cyclo-oxygenase, lipoxigenase and phospholipase in smooth muscle contraction in the isolated trachea. Br. J. Pharmacol. 82: 549-555.

- MONCADA, S.; FLOWER, R.J. & VANE, J.R. (1985). Prostaglandins, Prostacyclin, Thromboxane A₂ and leukotrienes. In: GOODMAN and GILMAN'S "The Pharmacological Basis of Therapeutics". GILMAN, GOODMAN, RALL & MURAD ed. 7th ed. Macmillan Publ. Co., New York. p. 660-663.
- MURAD, F. & KIMURA, H. (1974). Cyclic nucleotide levels in incubations of guinea-pig trachea. Biochim. Biophys. Acta. 343: 275-286.
- NADEL, J.A. & BARNES, P.J. (1984). Autonomic regulation of the airways. Ann. Rev. Med. 35: 451-467.
- NATH, P.; JOSHI, A.P. & AGRAWAL, K.P. (1983). Biochemical correlates of airway hyperreactivity in guinea-pig: role of lysophosphatidyl choline. J. All. Clin. Immunol. 72: 351-358.
- NEEDLEMAN, P.; CORR, P.B. & JOHNSON, E.M. Jr. (1985). Drugs used for the treatment of angina: organic nitrates, calcium channels blockers and β -adrenergic antagonists. In: GOODMAN and GILMAN'S "The Pharmacological basis of Therapeutics". GILMAN, GOODMAN, RALL & MURAD ed. 7th ed. New York. Macmillan Publ. Co., p. 810-811.
- NEEDLEMAN, P.; JAKSCHIK, B. & JOHNSON, E.M. Jr. (1973). Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 187: 324-331.
- NORTHOVER, B.J. (1971). Mechanism of the inhibitory action of indomethacin on smooth muscle. Br. J. Pharmacol. 41:

540-551.

- NORTHOVER, B.J. (1972). The effects of indomethacin on calcium, sodium, potassium and magnesium fluxes in various tissues of the guinea-pig. Br. J. Pharmacol. 45: 651-659.
- NORTHOVER, B.J. (1977). Indomethacin - a calcium antagonist. Gen. Pharmacol. 8: 293-296.
- OHNO, Y.; WATANABE, M. & KASUYA, Y. (1981). Manifestation of latent alpha-excitatory response in the canine tracheal smooth muscle preparation - Relation to basal tone. Arch. Int. Pharmacodyn. 251: 205-216.
- OMINI, C.; ABBRACCHIO, M.P.; COHEN, E.; DAFFONCHIO, L.; FANO, M. & CATTABENI, F. (1985). Involvement of arachidonic acid metabolites in adrenoceptor desensitization: functional and biochemical studies. Eur. J. Pharmacol. 106: 601-606.
- OREHEK, J.; DOUGLAS, J.S.; LEWIS, A.J. & BOUHUYS, A. (1973). Prostaglandin regulation of airway smooth muscle tone. Nature New Biol. 245: 84-85.
- OREHEK, J.; DOUGLAS, J.S. & BOUHUYS, A. (1975). Contractile responses of the guinea-pig trachea *in vitro*: Modification by prostaglandin synthesis inhibiting drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 194: 554-564.
- PARK, S. & RASMUSSEN, H. (1985). Activation of tracheal smooth muscle contraction: synergism between Ca^{2+} and

activators of protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8835-8839.

PELUS, L.M. & STRAUSSER, H.R. (1977). Prostaglandins and the immune response. Life Sciences 20: 903-914.

POPESCU, L.M.; PANOIU, C.; HINESCU, M. & NUTU, O. (1985). The mechanisms of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle. Eur. J. Pharmacol. 107: 393-394.

ROBINSON, C. & HOLGATE, S.T. (1985). Mast cell-dependent inflammatory mediators and their putative role in bronchial asthma. Clin. Sci. (Lond). 68: 103-112.

ROSS, E.M. & GILMAN, A.G. (1985). Pharmacodynamics: mechanism of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: GOODMAN & GILMAN'S "The Pharmacological Basis of Therapeutics". GILMAN, GOODMAN, RALL & MURAD. ed. 7th ed. Macmillan Publ. Co. New York. p. 37-38.

RUSSI, E.W. & AHMED, T. (1984). Calcium and calcium antagonists in airway disease. Chest. 86: 475-482.

SAKAMOTO, M.M. Efeitos farmacológicos de alcalóides benzil isoquinolínicos sobre a musculatura traqueal de cobaias. Campinas, 1983. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.

SHORE, S.A.; POWELL, W.S. & MARTIN, J.G. (1985). Endogenous prostaglandins modulate histamine - induced contraction in canine tracheal smooth muscle. J. Appl. Physiol. 58:

859-868.

SNYDER, D.W. & KRELL, R.D. (1984). Pharmacological evidence for a distinct leukotriene C₄ receptor in guinea-pig trachea. J. Pharmacol. Exp. Ther. 231: 616-622.

TAYLOR, P. (1985). Cholinergic agonists. In: GOODMAN and GILMAN'S "The Pharmacological Basis of Therapeutics". GILMAN, GOODMAN, RALL & MURAD ed. 7th ed. New York. Macmillan Publ. Co., p. 101.

VAN DEN BOSCH, H. (1980). Intracellular phospholipases A. Biochim. Biophys. Acta. 604: 191-246.

WIDDICOMBE, J.G. (1963). Regulation of tracheobronchial smooth muscle. Physiol. Rev. 43: 1-37.