

MELISA MIYASAKA SAKAMOTO

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DE ALCALÓIDES BENZIL-ISOQUINOLÍ-
NICOS SOBRE A MUSCULATURA TRAQUEAL DE COBIAS.

Tese apresentada ao Institu-
to de Biologia da Universi-
dade Estadual de Campinas ,
para obtenção do título de
Mestre em Biologia, na área
de Fisiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Urbano Morato Ferraz Meirelles

CAMPINAS

-1983-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Sa29e

4930/BC



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: MELISA MIYASAKA SAKAMOTO

Nº de Identificação: 825279

Endereço para Correspondência: Depto. de Farmacologia - IB.-UNICAMP

Curso: Fisiologia

Nome do Orientador: Urbano M. F. Meirelles

Título da Dissertação ou Tese: "Efeitos farmacológicos de alcaloides benzil-isoquinolínicos sobre a musculatura traqueal de cobaias".

Data proposta para a Defesa: 25/04/83

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

 / /
Data

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

 / /
Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

07 /04/ 83

Data

 Miyasaka Sakamoto
assinatura do aluno

De acordo:

 Urbano M. F. Meirelles
Orientador

Aos meus pais, pelo exemplo de dignificar
o trabalho com a honestidade.

Ao Shiguetto, pelo apoio e compreensão de
todos os momentos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. URBANO M. F. MEIRELLES, com quem me iniciei na carreira científica, pela dedicação e pelas lições de atitude científica que, tenho certeza, marcarão profundamente minha formação no campo da pesquisa.

Aos Professores Drs. ADERBAL MAGALHÃES, FRANCISCO DE ASSIS M. REIS e ANITA J. MARSAIOLI, do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química da UNICAMP, pela extração dos alcalóides utilizados nesse trabalho.

Um especial agradecimento aos Professores Drs. HIROSHI AOYAMA, NILCE C. MEIRELLES e F.C. STRONG III, pelas sugestões e discussões úteis na determinação dos compostos em estudo.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia, pelo apoio e compreensão dispensados durante a realização deste trabalho.

A todos que de um modo ou de outro contribuíram para a execução deste trabalho, em especial às acadêmicas GLAUCE A. PINTO, ONEIDA DIAS e LUIZ CARLOS REIS, pelo auxílio e constantes incentivos.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, pela concessão de bolsas de estudo durante os anos de 1978 a 1981.

CONTEÚDO

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
I - CONSIDERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS SOBRE AS VIAS AÉREAS RESPIRATÓRIAS	1
A. Brônquios e traquéia	1
B. Inervação	2
C. Receptores	4
D. Controle Endógeno do Tono Intrínseco	7
II - CARACTERÍSTICAS DA PREPARAÇÃO: CADEIA TRA- QUEAL ISOLADA DE COBAIA	9
III - ALCALÓIDES BENZIL-ISOQUINOLÍNICOS	11
A. Generalidades	11
B. Propriedades biológicas	12
IV - OBJETIVOS	15
MATERIAL E MÉTODOS	
I - MATERIAL	16
A. Alcalóides Benzil-Isoquinolínicos (A.B.I. Qs.)	16
1. Nomes Químicos e Vulgares	16
2. Fórmulas e Abreviaturas	16
B. Procedência	17
1. Alcalóides	17
2. Drogas	17
3. Animais	18
C. Aparelhagem	18
1. Para Registro Gráfico das Atividades Musculares "In Vitro"	18
2. Para Determinação das Constantes de Dissociação dos Alcalóides Benzil - Isoquinolínicos	20

II - MÉTODOS	
A. Preparo das Soluções dos Alcalóides ...	21
B. Composição do Líquido de Perfusão	21
C. Preparo das Soluções-tampão para Determinação dos pK_a s	21
D. Determinação dos pK_a s	22
1. Método gráfico	23
2. Método matemático	23
E. Montagem da Preparação	24
F. Técnica para Executar a Estimulação Mecânica da Preparação	25
G. Respostas Contráteis ao Carbacol (CBC).	26
H. Determinação da Potência Espasmolítica dos A.B.I.Qs. após Contração pelo CBC..	27
I. Efeito Inibitório Residual dos A.B.I.Qs.	27
1. Situação de equilíbrio para os antagonistas	27
2. Situação de não equilíbrio para os alcalóides e para o agonista	28
3. Situação de equilíbrio para o agonista	29
J. Variações da Concentração dos A.B.I.Qs. Durante os Experimentos	30
RESULTADOS	31
I - Determinação dos pK_a s dos Alcalóides Benzil-Isoquinolínicos	31
II - Cinética de Relaxamento e Recuperação da Capacidade de Contração ao Carbacol	40
III - Medida da Atividade Espasmolítica Produzida por Duas Doses Diferentes de Alcalóides	49

IV - Inibição Residual dos A.B.I.Qs. em diferen <u>tes</u> Tempos de Contato, Avaliada pelo CBC em Dose Simples	53
V - Respostas à Adição Cumulativa do CBC em Presença dos A.B.I.Qs.	56
VI - Característica do Músculo Traqueal Isolado da Cobaia	63
A. Efeito da Temperatura	65
DISCUSSÃO	68
RESUMO E CONCLUSÕES	79
SUMMARY	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

I - CONSIDERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS SOBRE AS VIAS AÉREAS RESPIRATÓRIAS

A. Brônquios e Traquéia

Cresce o interesse no estudo da fisiologia e farmacologia das vias aéreas respiratórias, quer pelo fato de estarem expostas a número e diversidade crescentes de substâncias suspensas no ar atmosférico, quer para serem analisadas as respostas biológicas a esses agentes e a outros potencialmente úteis em terapêutica. Daí ser essencial também um conhecimento da morfologia dessas estruturas e de sua resistência à manipulação no preparo e execução dos experimentos.

A traquéia consta de número variável de anéis cartilagosos em forma de ferradura, cujas extremidades livres voltadas dorsalmente interligam-se por delicada musculatura, (Comroe, 1976). Esta é que permite a invaginação da parede posterior do tubo traqueal quando se manifesta por exemplo o fenômeno da tosse, reduzindo o lumen traqueal a uma fenda longitudinal em U, resultando em alta velocidade do fluxo de ar que facilita e apressa a remoção de quaisquer excessos de secreção. A traquéia é revestida internamente por epitélio pseudo-estratificado colunar ciliado, com numerosas células caliciformes. Tanto na traquéia como nos brônquios o revestimento consiste de uma complexa organização: células basais curtas são mais proeminentes no fundo, com células altas providas de bordadu-

ra em escova interpostas, células caliciformes e células colunares ciliadas. Já o revestimento dos menores brônquios consiste de apenas uma camada simples de células colunares e ciliadas (Avery e cols. 1973).

Os brônquios apresentam as placas de cartilagem irregulares, sua musculatura lisa se dispõe em espiral aderida internamente a elas. Essas simples considerações nos alertam contra a tendência bastante comum de considerar a traquéia como um tubo rígido ou passivo para a condução do ar. Na sua porção extra-torácica ela sofre modificações profundas em suas dimensões nos atos forçados, quando a pressão intra-luminal pode subir até 100 a 300 mm Hg. Essas modificações na dimensão são fisiologicamente importantes, como adverte Widdicombe (1963), já que uma pressão de 10mm de água produz aumento de 40 a 56% de seu volume.

B. Inervação

Traquéia e brônquios recebem fibras nervosas eferentes do nervo vago e do tronco simpático torácico. Sob determinadas condições a excitação do nervo vago dá origem a broncodilatação, principalmente quando o tônus inicial é elevado. Não se trata de artefato pela estimulação do tronco vago simpático. Realmente, Dixon e Brodie já em 1903, (citado por Widdicombe, 1963), concluíram que o próprio nervo vago contém fibras bronco-diladoras, além das constrictoras, fato confirmado e estendi-

do para cobaias, cães, gatos e coelhos (Hawkins e Paton, 1958).

A musculatura lisa traqueal, quanto à inervação, é do tipo multi-unitário (Bozler, 1948). Em cães, Stephens e cols. (1975) estimularam mecanicamente por meio do ergômetro de Levin-Wyman, fibras musculares da traquéia cervical, procurando provocar o aparecimento de respostas miogênicas, obtendo contrações cíclicas com produção de potenciais de ação. Nesse mesmo ano Kroger e Stephens interpretaram esses resultados admitindo a existência de marca-passos normalmente latentes que seriam despertados por substâncias que estimulam diretamente o músculo, como altas concentrações de potássio, aminas adrenérgicas e acetilcolina. Afirmaram ainda que esses agentes podem converter o músculo liso do tipo multi-unitário vascular em preparações funcionalmente iguais às de músculo unitário simples, exibindo potencial de ação conduzido e contrações rítmicas. Células de músculos lisos unitários simples demonstram atividade elétrica espontânea, com despolarização cíclica, desenvolvimento de potenciais de ação e uma resposta miogênica. Culturas de tecido de músculo traqueal de embrião de pintos mostram contrações rítmicas a cada 10 a 60 segundos em função da temperatura. É possível que tais marca-passos não sejam latentes, mas tenham seu funcionamento ligado a alterações rítmicas do diâmetro traqueal, podendo ser detectadas somente por processos especiais, como fizeram Souh^ura da e Dickey (1976) por meio de micro "strain gauges".

A hipótese de Burnstock (1972), que admite características purinérgicas para a inervação não-adrenérgica não colinérgica de vários territórios, é defendida por vários autores quanto a sua existência na traquéia da cobaia. Assim, Coburn e Tomita (1973) identificaram respostas inibitórias após estimulação de campo e fatores purinérgicos envolvidos na transmissão. Farmer e Farrar (1976) estudaram os efeitos farmacológicos de vários derivados da adenina, fosforilados ou não, sobre o músculo traqueal da cobaia e concluíram pela existência de receptores específicos para nucleotídeos nesta preparação, enquanto que Coleman (1980) pretende haver demonstrado receptores para a adenosina na traquéia nesta mesma espécie animal.

C. Receptores

É vasta a literatura descritiva da distribuição de receptores farmacológicos na traquéia da cobaia. A esse respeito essa estrutura tem sido considerada como a melhor para estudos visando indiretamente obter informação útil para análise futura de possibilidade terapêutica do homem.

Collier, em 1970, em ampla revisão afirma: "a maior parte dos nossos experimentos foram realizados na cobaia, útil no trabalho de laboratório sobre asma, por várias razões. Primeiro, na anafilaxia da cobaia o trato respiratório é o primeiro - mas não o único - sistema a-

tingido intensamente. Segundo, a cobaia sensibilizada produz, quando em contato com o antígeno, meia dúzia de tipos de substâncias, várias das quais presentes em reações alérgicas humanas. Terceiro, o músculo bronquial da cobaia responde mais rapidamente que o de muitos outros animais de laboratório a esses endógenos. Quarto, essa resposta pode ser usada para mostrar antagonismos a essas substâncias. Quinto, a resposta do trato respiratório da cobaia a substâncias endógenas se assemelha suficientemente àquelas do paciente humano asmático."

Uma excelente descrição dos receptores beta-adrenérgicos pode ser encontrada em Foster (1966). São do sub-tipo beta-2 na classificação proposta por Lands e cols. (1967). Alguns poucos autores admitem a existência de alfa-adrenoceptores na traquéia da cobaia (Chahl e O'Donnell, 1971; Everitt e Cairncross, 1969).

Dentre numerosos autores que estudaram as respostas mediadas por receptores histaminérgicos na traquéia estão Drazen e cols. (1979), que concluíram pela presença de receptores do tipo H_1 mediadores de respostas broncoconstrictoras ao 2-PEA, agonista específico (2-(2-piridil)etilamina); também do tipo H_2 que mediam respostas ao dimaprit, S-(3-(N,N-dimetilamino) propil) isotiouréia, especificamente bloqueadas pela metiamida, antagonista H_2 . (Chand e Eyre, 1975; Okpako e cols, 1978).

A bradicinina contrai a traquéia da cobaia, porém menos intensamente que a histamina. Já nas vias intrapulmonares o efeito da bradicinina é fortemente constrictor.

tivo e complexo, podendo ou não ser antagonizado pelo ácido acetil-salicílico. Já na preparação de James, a bradicinina, por via venosa, baixa a tensão na traquéia, sendo esse relaxamento abolido pelo propranolol, o qual aumenta a constrição na área pulmonar (Collier, 1970).

A serotonina (5-HT), contrai todas as vias aéreas onde o estreitamento é possível (Collier, 1970), embora no homem normal raramente produza broncoconstrição. Já em pacientes asmáticos pode provocar desencadeamento de crise. (Douglas, 1980).

As respostas da musculatura traqueal à dopamina (DPM) podem ser diretas ou indiretas, de relaxamento ou de constrição mas se realizam através da mediação de receptores adrenérgicos α ou β . Não há caracterização de receptores específicos à DMP bloqueáveis pelo haloperidol, nesta estrutura segundo Koga e cols. , 1980.

Embora numerosos produtos do metabolismo do ácido araquidônico participem ativamente da fisiologia da musculatura traqueal, não há, a exemplo do que ocorre em outros tecidos, definição de receptores específicos, nem bloqueadores específicos, conforme detalharemos no ítem seguinte, e na discussão. (Orehek e cols. 1975).

Türker e Ercan (1976) relataram relaxamento da traquéia de gatos pela angiotensina I e II, porém ambas respostas podiam ser antagonizadas pela aspirina.

D. Controle Endógeno do Tono Intrínseco

Há abundante evidência experimental de que o tono da musculatura lisa da maioria dos órgãos é modulado pela produção de prostaglandinas (PG). Revisando esse assunto, Ferreira e Vane (1974) descreveram que numerosos estímulos são capazes de ativar o sistema multienzimático que exige oxigênio molecular e alguns cofatores e transforma o ácido araquidônico em vários compostos.

Gryglewski e Vane (1972) verificaram também que fragmentos de baço, submetidos a vibrações, apresentavam acelerada produção de PGs, principalmente se se adicionava o substrato precursor exógeno, ácido araquidônico (ARA). Esse fato foi interpretado como ativação de PG-sintetase pela perturbação mecânica.

Coleman e Farmer (1971) descreveram o desenvolvivimento de tono no músculo traqueal isolado de cobaia, medido através da pressão intraluminal, que diminui sob a ação de estimulantes de beta adrenoceptores. Observaram que podiam aumentar essa pressão intra-luminal expondo momentaneamente o órgão à pressão atmosférica. Em 1973 Orehek e cols., com a espiral de traquéia em condições isométricas, mostraram que a regulação do tono da musculatura lisa traqueal é em grande parte determinada pela produção endógena de prostaglandinas que podem ser ensaiadas em estômago isolado de rato. Quando a traquéia da cobaia é contraída pela adição de histamina ao banho, ou pela acetilcolina, pode-se comprovar a concomitante

liberação de prostaglandinas.

Em 1975 foi demonstrado que quando estimulam a traquéia isolada de cobaia fazendo roçar um bastão de vidro na face serosa nada ocorre, mas repetindo se o estímulo na face mucosa a preparação contrai e libera substância(s) com atividade de prostaglandina; a presença destas substâncias foi comprovada por cromatografia: PGE_2 e PGF_2 e a inibição da produção dessas substâncias ocorre pelo tratamento com indometacina ou outros anti-inflamatórios não esteróides. (Orehek e cols., 1975).

Newman e cols. (1978) estudaram comparativamente, o efeito miorelaxante de treze substâncias na traquéia, apenas contra o tono intrínseco, isto é, sem a prévia contração por agonistas.

Lambley e Smith (1975) verificaram também que a musculatura traqueal tratada pelo ARA responde com contração, parcialmente devida a síntese de PGs, confirmando a hipótese de que essas substâncias estão envolvidas na manutenção do tono da preparação.

Em 1972, Ferreira e cols. identificaram, por meio de bioensaio, atividade de prostaglandina, que se acumula no líquido perfusor de uma preparação isolada de jejuno de coelho. Mostraram que essa atividade cresce com o tempo de incubação e com uma variedade de estímulos, e ainda, que não é afetada pela adrenalina ou

pela papaverina.

II - CARACTERÍSTICAS DA PREPARAÇÃO: CADEIA TRAQUEAL ISO LADA DE COBAIAS

Caracteristicamente, as preparações de músculo liso traqueal usadas "in vitro", obtido de animais de pequeno porte são colocadas em perfusão com a cartilagem a qual está unida, ou parte dela.

O primeiro dos métodos bem sucedidos foi o proposto por Castilho e de Beer, em 1947. Constava de vários anéis ligados entre si, porém completos, isto é, fechados, não permitindo obtenção de boas respostas.

Em 1959, Akçasu, propôs uma preparação semelhante à anterior porém, com os anéis abertos, o que já permitia maior amplitude às contrações isotônicas.

O avanço técnico mais significativo nesse sentido foi, entretanto o introduzido por Foster (1960), que a partir de traquéias de duas cobaias separava cada uma, combinava os anéis alternadamente, para confeccionar duas cadeias de oito anéis com as quais obtinha respostas praticamente idênticas para tratamentos e condições iguais.

Alguns autores, por considerar trabalhosa a execução da técnica de Foster, optaram pela preparação

traqueal em espiral usada pela primeira vez por Constantine em 1965. Os registros são geralmente isométricos, o preparo é mais simples porém, na nossa experiência, (Sakamoto e Meirelles, 1979, não publicado), a sensibilidade é mais baixa, e tem menor alcance farmacológico. O mesmo se pode dizer de várias preparações constituídas pelo tubo traqueal intato "in vitro", cuja única justificativa seria a de permitir a realização de estimulação de campo. (Foster, 1966; Jones e cols. 1980; Carlyle, 1964; Coleman e Farmer, 1971; Coleman, 1980).

A preparação descrita por Coleman e Farmer em 1971 consta da montagem do tubo traqueal "in vitro", de modo a permitir medidas das variações da pressão intraluminal em resposta a agonistas como a histamina ou o carbacol, e mesmo a determinação do pA_2 para a atropina ou a mepiramina.

Nas nossas condições experimentais, como descrito em "métodos", a preparação de Foster (1960), com mínimas modificações apresenta elevada sensibilidade a agonistas colinérgicos principalmente ao carbacol, com o qual se podem obter respostas sub-máximas com 22 μM /ml do banho. Também o antagonismo deste efeito com atropina apresenta reversibilidade mais fácil que muitas outras preparações. Agonistas e antagonistas específicos beta-adrenérgicos (Chahl e O'Donnell, 1971; O'Donnell e Wanstall, 1980), e histaminérgicos (H_1 e H_2) continuam sendo amplamente estudados nessa preparação (Tomioaka e Yamada, 1982; Okpako e cols., 1978). Tal como nos referiremos com detalhes na discussão, as características

de manifestação do sistema intrínseco prostaglandinérgico modulador do tono representam vantagem inconteste desta preparação quando se a compara com o mesmo sistema em jejuno isolado de coelho (Ferreira e cols, 1972) se levamos em consideração a importância da participação de substâncias endógenas em patologias do aparelho respiratório, principalmente as de fundo imuno-alérgico.

III - ALCALÓIDES BENZIL-ISOQUINOLÍNICOS

A. Generalidades

Efeitos biológicos de alcalóides benzil-isoquinolínicos são conhecidos de longa data. Já em 1914 Pal, afirmava que a papaverina (PAV), droga padrão do grupo "relaxa o tono de todos os músculos lisos sem interferir com a contração normal". Esta substância, e em menor escala seu análogo estrutural etaverina foram utilizados na terapia de vários processos patológicos, como "no enfarto agudo do miocárdio, na angina pectoris, na asma brônquica, na cólica biliar..." (Grollman, 1951). A PAV também diminui a susceptibilidade do coração à fibrilação ventricular provocada tanto pela estimulação elétrica, como pela ligadura da coronária (Sollmann, 1949).

Atualmente, a posição da papaverina face ao interesse na pesquisa científica é peculiar: ao mesmo tem

po em que é considerada "droga obsoleta na terapêutica de todos os processos nos quais fora utilizada, e, tendo sido substituída por agentes não significativamente mais eficazes" (Nickerson, 1975), cresce bastante o número de trabalhos de pesquisa principalmente sobre seu mecanismo de ação (vide revisão por Ferrari, 1974).

O fator decisivo nessa retomada de interesse pela PAV foi a descoberta de que ela exibe numerosas ações que puderam ser detectadas e analisadas a nível bioquímico, às quais nos referiremos resumidamente.

B. Propriedades Biológicas

Em 1970, Triner e cols, descobriram que a papaverina é poderoso agente inibidor da fosfodiesterase do 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (AMP_c), protegendo o nucleotídeo da hidrólise enzimica. No mesmo ano já foi feita a sugestão de que inibidores desta fosfodiesterase influenciariam, como tais, a contratilidade e o tônus da musculatura lisa (Kukovetz e Pösch, (1970)).

Pelo fato de produzir seu típico efeito miorelaxante de modo direto, isto é, sem envolver receptores farmacológicos, a papaverina tem sido referida como agente musculotrópico espasmolítico inespecífico, ou "miotrópico negativo", pelo fato de manifestar seu característico efeito contra qualquer agonista, embora exerça ações bem definidas também sobre eventos elétricos no músculo liso (Ferrari e Maragno, 1970; Tashiro e Tomita,

1970).

Em 1963, Santi e cols. demonstraram que a PAV inibe fortemente a fosforilação oxidativa. Esta ação poderia explicar a "seletividade relativa" com que este alcalóide inibe a fase tônica do "twitch" de alguns músculos lisos que é altamente dependente de metabolismo aeróbico, em relação à componente fásica da contração.

Ferrari e cols. (1971) verificaram que a papa-verina pode produzir dissociação entre os eventos elétricos e mecânicos na "taenia coli" da cobaia, isto é, a supressão dos "spikes" é transitória mesmo em presença do inibidor, conquanto persista a inibição mecânica.

Outra propriedade importante da PAV é a de inibir a facilitação produzida por fosfolípidos, do transporte de cálcio de uma fase aquosa para uma fase apolar, em equilíbrio (Carpenedo e cols., 1968).

Em 1961, Rothschild e cols. demonstraram que a liberação de histamina pelo composto 48/80 depende de intermediários metabólicos gerados provavelmente pela via glicolítica. A PAV inibe essa liberação de histamina, porém sem modificar a concentração do AMP_c, ou a atividade de sua fosfodiesterase, reduzindo, entretanto, os níveis de ATP (Fredholm e cols., 1976).

As ações musculares da PAV não se limitam a musculatura lisa. No músculo extensor digital de Rana pi piens, este alcalóide além de antagonizar as contraturas pela cafeína e pelo potássio provoca fenômeno bifásico de contratura que atinge o máximo após 5 a 6 minutos, seguida de relaxamento. (Buttar, 1969).

No diafragma isolado de ratos, além de outros efeitos a PAV estimula intensamente a glicogenólise (Triner e col. 1970). Bauer e Cãpek estudaram, em 1971, os efeitos da PAV na preparação frênico-diafragmática e no diafragma cronicamente desnervado de ratos, concluindo que a propriedade curariforme observada seria pós-sináptica e a-despolarizante. Puyou e cols., (1977) estudaram os efeitos de um análogo estrutural da PAV, o MMIQ, no músculo reto abdominal de sapo, após analisarem a inibição que este alcalóide exerce sobre a fosfodiesterase do AMP_c (Vercesi e cols., 1975). A seguir determinaram a capacidade do MMIQ de inibir a respiração celular em mitocôndria isolada de ratos (Meirelles e cols. 1978_a). Os mesmos autores estudaram no diafragma isolado de ratos, ações da desmetoxipapaverina (DMP), enquanto que na preparação frênico-diafragmático analisaram as contraturas produzidas pela acetilcolina ou pelo íon potássio no músculo cronicamente desnervado, sobre a contratilidade, e sobre o potencial de repouso e potenciais em miniatura de placa terminal (Meirelles e cols., 1978_{b,c}).

Em recente revisão (Preininger, 1975) sobre a farmacologia e toxicologia de "alcalóides papaveráceos" com cerca de 690 referências bibliográficas, não há menção sobre efeitos destes compostos na musculatura lisa isolada do trato respiratório, conquanto se destaque a proteção conferida pela PAV e dois análogos, "in vivo", contra o broncoespasmo produzido pela inalação de aerosol de acetilcolina ou de histamina.

IV - OBJETIVOS

Nossa proposição é a de estudar o efeito dos cinco alcalóides benzil-isoquinolínicos sobre a cadeia traqueal isolada de cobaias, visando principalmente:

a) conhecer a relação de potência miorelaxante dos alcalóides.

b) conhecer a capacidade de resposta contrátil ou de recuperação desta capacidade pelo sistema biológico ao agonista escolhido, o carbacol.

c) conhecer características desta preparação como objeto para testes, face ao sistema intrínseco que, pelo menos "in vitro", é modulador do tono.

MATERIAL E MÉTODOS

I. MATERIAL

A. ALCALÓIDES BENZIL-ISOQUINOLÍNICOS (A.B.I.Qs.)

1. NOMES QUÍMICOS E VULGARES

a. 1-(3,4-dimetoxibenzil)-6,7-dimetoxiisoquinolina

PAPAVÉRINA

b. 1-(p-metoxibenzil)-6,7-dimetoxiisoquinolina

DESMETOXIPAPAVÉRINA

c. 1-(p-metoxibenzil)-6,7-metilenodioxiisoquinolina

DIOXIMETVERINA

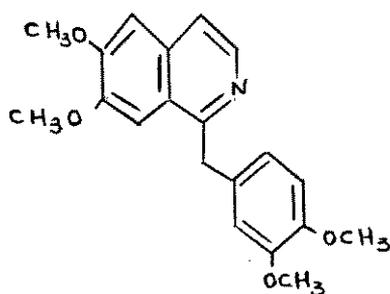
d. 1-(α -hidroxi-3,4-dimetoxibenzil)-6,7-dimetoxiisoquinolina

PAPAVÉRINOL

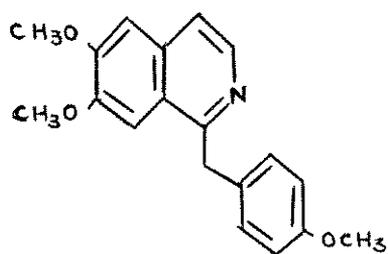
e. 1-(2-nitro-4,5-dimetoxibenzil)-6,7-dimetoxiisoquinolina

NITROPAPAVÉRINA

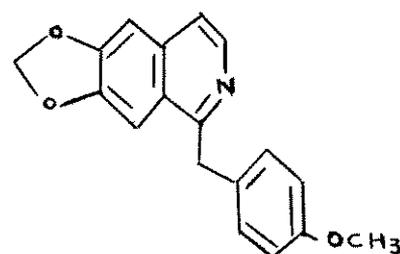
2. FÓRMULAS E ABREVIATURAS



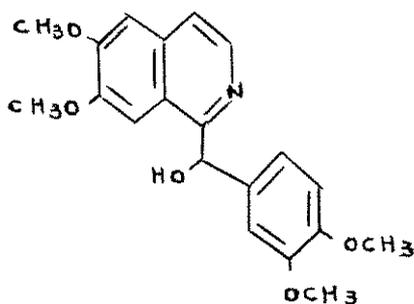
PAPAVÉRINA
(PAV)



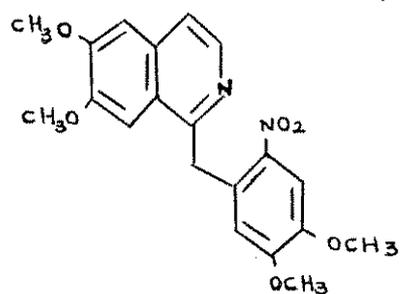
DESMETOXIPAPAVÉRINA
(DMP)



DIOXIMETVERINA
(MMIQ)



PAPAVÉRINOL
(PAV-OH)



NITRO-PAPAVÉRINA
(NO₂-PAV)

B . PROCEDÊNCIA

1. Dos Alcalóides

O MMIQ e o DMP foram extraídos do lenho de árvores Ocotea sp. que crescem nos arredores de Manaus. A papaverina foi adquirida de "British Drug House" (BDH) ; o papaverinol e a nitropapaverina foram preparadas a partir da papaverina, no laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas.

2. Drogas

	Procedência
Ácido bórico	Merck
Ácido cítrico	Merck
Ácido clorídrico	Baker
Atropina (ATR)	Merck
Bicarbonato de sódio	Baker
Borato de sódio	Baker
Carbacol	Sigma
Carbonato de sódio	Merck
Citrato de sódio	Baker
Cloreto de cálcio	Merck
Cloreto de potássio	Baker
Cloreto de sódio	Merck
Fosfato dibásico de sódio	Baker
Fosfato monobásico de sódio	Merck

Glicose	Merck
Indometacina (IDMTC)	Merck-Sharp-Dhome
Isoproterenol (IS)	Sterling-Winthrop
Sulfato de magnésio	Merck

3. Animais

Para a execução desse trabalho foram utilizadas cobaias, Cavia porcellus, machos ou fêmeas, pesando 200 a 400 g, adquiridas de fornecedor particular ou cedidas pela Rhodia Indústrias Químicas Ltda.

C. APARELHAGEM

1. Para Registro Gráfico das Atividades Musculares "In Vitro"

Os registros mecânicos do músculo foram obtidos através da conexão de uma alavanca inscritora tangencial isotônica entre a preparação "in vitro" e um tambor esfumaçado. Usamos sempre a mesma velocidade, em dois quimógrafos da marca "Palmer" sempre com o mesmo cilindro e portanto as velocidades correspondem aproximadamente a 0,6 mm/min na inscrição.

A alavança inscritora, fina e bem leve, dá uma amplificação da resposta muscular de nove vezes e suporta uma carga de 500 miligramas. Seu atrito com o papel

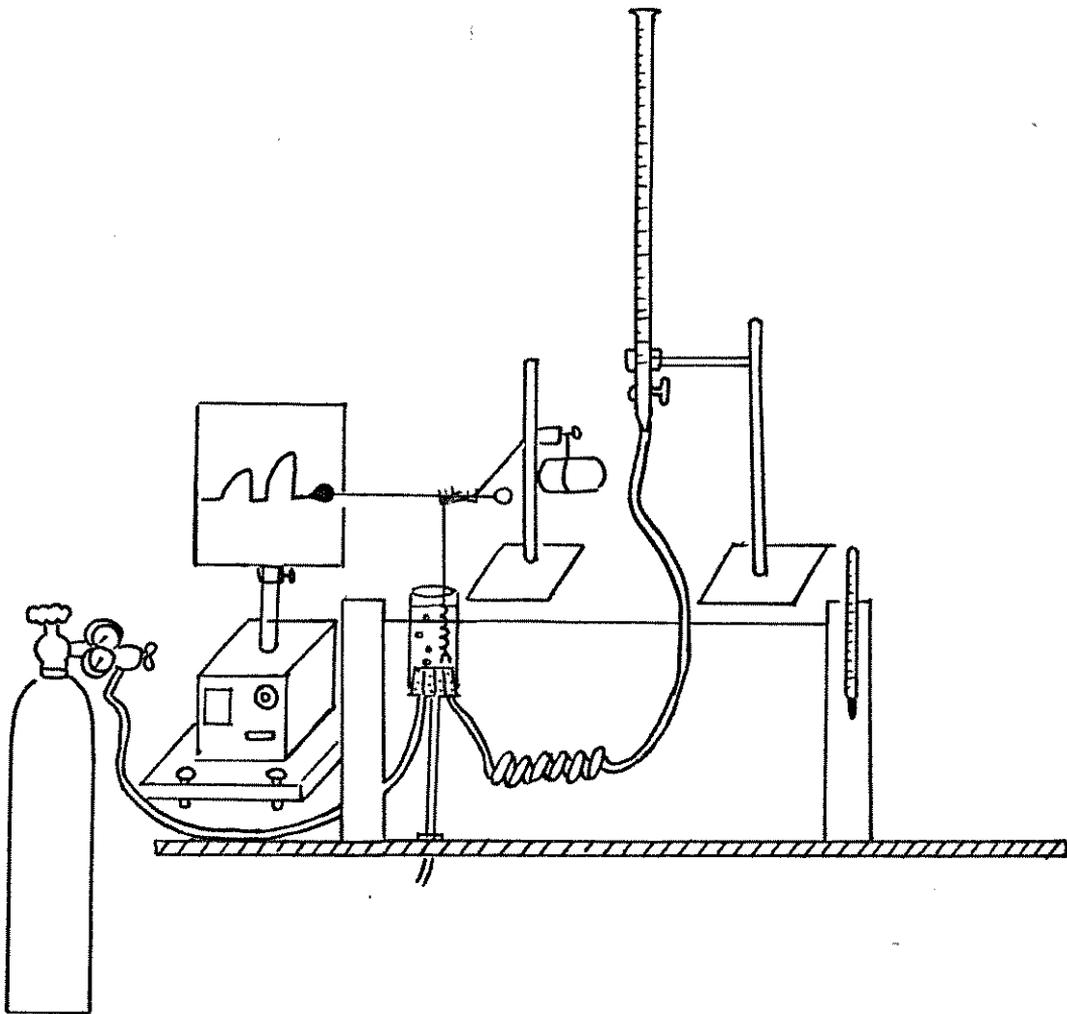


FIG. 1 - Esquema do sistema utilizado para análise da atividade da musculatura lisa traqueal isolada.

esfumaçado é diminuído pela vibração de uma bomba de aquário suspensa à base da mesma haste de fixação da alavanca.

O volume do líquido nutritivo perfusor da preparação foi medido em bureta e aquecido progressivamente à medida que passa pela serpentina colocada no banho-maria, à temperatura constante de 37°C , até chegar à cuba de 10 ml, onde se encontra a preparação isolada devidamente aerada com 5% de CO_2 em O_2 .

A parte inferior dessa cuba é fechada por meio de uma rolha de borracha, transpassada por três condutos: um, mais fino, correspondente à entrada do carbogênio, o seguinte para entrada do líquido nutritivo, e o terceiro, por onde se dá o esvaziamento da cuba, ligado a uma trompa de vácuo.

2. Para Determinação das Constantes de Dissociação dos Alcalóides Benzil-Isoquinolínicos

Para determinação dos valores de pK_a s dos alcalóides benzil-isoquinolínicos foi empregado espectrofotômetro "Varian", modelo 634, acoplado a um registrador "Hewlett-Packard" modelo 7044A.

Diversas soluções-tampão foram preparadas e seus pH ajustados com auxílio de um potenciômetro digital centesimal, "Ambriex", pH 0-14 de -5° a 100°C , com elétrodo conjugado.

II. Métodos

A. Preparo das Soluções dos Alcalóides

Todos os alcalóides foram utilizados sob forma de cloridratos; seus sais foram pesados e deixados por aproximadamente dez horas em contato com uma pequena quantidade de água desionizada (0,1-0,5 ml) e completada a dissolução no momento do uso. Para o preparo de algumas soluções dos alcalóides foi necessário aquecimento até 60°C, para agilizar sua solubilização.

B. Composição do Líquido de Perfusão

As preparações foram montadas em soluções de Krebs - Henseleit, cuja composição em milimoles por litro é a seguinte: NaCl 119,0; CaCl₂ 2,5; MgSO₄H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 24,9; e glicose 5,0.

C. Preparo das Soluções-Tampão para Determinação dos pK_as

Os tampões foram feitos com a mistura dos componentes abaixo relacionados resultando força iônica de 0,1 u, conforme descrito por Gomori, (1965).

O pH final foi conferido potenciométricamente no momento do uso e após adição do alcalóide.

Os dados seguintes mostram as várias substân -

cias utilizadas e os respectivos pHs.

COMPONENTES	pH
Ácido clorídrico	2,0
Citrato de potássio	
Ácido cítrico	3,0
Citrato de sódio	4,0
	5,0
	5,5
Fosfato monobásico de sódio	6,0
Fosfato dibásico de sódio	6,5
	7,0
	7,5
Ácido bórico	8,0
Borato de sódio	9,0
Bicarbonato de sódio	9,5
Carbonato de sódio	10,0

D. Determinação dos pK_a s

Os espectros de absorção dos A.B.I.Qs. foram estudados variando-se os comprimentos de onda de 220 a 270 μm em treze soluções-tampão, com valores de pH entre 2 e 10.

Os valores dos pK_a s dos alcalóides foram determinados por dois processos diferentes, a partir do gráfico obtido no espectrofotômetro-registrador, no qual a densidade ótica está em ordenadas contra o comprimento de onda em abcissas, e pelo processo matemático.

1. Método Gráfico

Selecionamos os dois comprimentos de onda no qual ocorrem os picos máximos de absorção e lançamos absorbância contra pH, em ordenadas e abcissas, respectivamente, para cada alcalóide e, a partir do gráfico assim obtido, determinamos os valores dos pK_a s. Inicialmente, traçamos seis retas auxiliares aderentes às partes inclinadas e assintóticas, correspondendo quatro à parte assintótica e duas às partes inclinadas. Essas retas se interceptam delimitando dois segmentos oblíquos, cujos pontos médios são calculados e projetados sobre as abcissas se lê(em) diretamente o(s) valor(es) procurado(s).

2. Método Matemático

Para determinação matemática dos valores de pK_a foi empregado o procedimento de Biggs, (1954), que resumidamente é o seguinte: a partir do gráfico obtido no espectrofotômetro-registrador, coletamos todos os valores de absorbância no comprimento de onda onde ocorre o pico máximo de absorção do composto, em solução ácida.

Nota-se que a absorvância em um mesmo comprimento de onda diminui a medida que a solução-tampão se torna mais alcalina. Aplica-se a equação que expressa a lei de Beer para obtenção do coeficiente de extinção molar (ϵ) e da concentração dos compostos nas duas espécies, ionizada e não-ionizada, no comprimento de onda previamente escolhido. Como neste comprimento de onda coexistem as duas espécies ionizada e não ionizada, efetuamos: $A = \epsilon_1 bc_1 + \epsilon_2 bc_2$ onde A é a absorvância, ϵ_1 representa coeficiente de extinção molar do composto na forma dissociada e ϵ_2 representa o mesmo coeficiente na forma não dissociada; b é a espessura em centímetros da solução atravessada pela luz; c_1 é a concentração do composto na forma ionizada e c_2 na forma não-ionizada.

A constante de equilíbrio (K) é obtida aplicando-se a lei de ação das massas:

$$K = \frac{(H^+) (B^-)}{(BH)}$$

E. Montagem de Preparação

O método utilizado é, essencialmente o de Foster (1960).

Duas cobaias em jejum hídrico de doze horas são sacrificadas por fratura cervical e sangramento por secção dos vasos do pescoço. Colocadas em decúbito dorsal, a pele é rebatida desde a região abdominal até a região mentoniana por sobre a cabeça do animal. Os músculos e

demais tecidos que recobrem a traquéia são, então, divulsionados e depois seccionados, de maneira a expor o tubo traqueal em toda a sua extensão. As traquéias excisadas dos dois animais são transferidas imediatamente para uma placa de Petri com Krebs-Henseleit à temperatura ambiente, sob arejamento contínuo com carbogênio, onde são separadas de resquícios de tecido adiposo e vascular.

Os tubos traqueais são cortados transversalmente em doze anéis e esses são combinados de forma que o primeiro de uma traquéia se combine com o segundo de outra e assim por diante até a totalização dos doze. Cada conjunto de doze anéis é separado em duas placas de Petri, sendo cada anel aberto por secção da cartilagem no polo oposto à localização do músculo.

A seguir os cotos cartilagosos são amarrados dois a dois, quatro a quatro e finalmente em três grupos de quatro anéis que ligados entre si completam a preparação. As extremidades da cadeia são amarradas rigidamente com fio de algodão à alavanca inscritora e a um gancho metálico preso no fundo da cuba de perfusão.

F. Técnica para Executar a Estimulação Mecânica da Preparação

Sem a utilização de aparelhagem especial executamos rotineiramente essa estimulação, simplesmente submetendo a preparação à tensão de seu próprio peso, pelo rápido esvaziamento do banho e rapidamente completando o

volume com o mesmo líquido retido em um compartimento paralelo de vidro, à mesma temperatura. Além da simplicidade, uma das vantagens desse processo é que submete preparações mais ou menos robustas (de maior ou menor peso) a tensões proporcionalmente maiores ou menores, de modo exato, simplesmente pela subtração do empuxo da massa líquida que sustenta parcialmente a cadeia. Por meio de um cálculo simples se pode conhecer e expressar numericamente a força a que fica submetida a preparação quando o banho se esvazia e ela ocupa posição central ao longo da cuba vertical cilíndrica.

G. Respostas Contráteis ao Carbacol (CBC)

De numerosos experimentos prévios sabemos que nas condições usuais, as preparações de cadeia traqueal respondem ao CBC em concentração de $5,5 \times 10^{-9}$ M, limiar aproximado de resposta mínima, até $5,5 \times 10^{-8}$ M, que corresponde aproximadamente a resposta isotônica máxima. Assim, usando limitadas doses e ainda através de estimulação mecânica conhecemos o estado funcional de cada cadeia traqueal. Uma vez obtida resposta maximal pela adição de CBC em dose simples, procedíamos uma redução de dose até obtenção de resposta constante, de amplitude igual a 70 a 90% da máxima.

H. Determinação da Potência Espasmolítica dos A.B.I. Qs. após Contração pelo CBC

Após contração sub-máxima ao CBC foram utilizadas pelo menos duas doses para cada alcalóide, de $7,2 \times 10^{-5}M$ e de $1,8 \times 10^{-5}M$, para períodos de incubação de 30 ou de 60 minutos. Na maioria dos experimentos registramos os tempos, tanto durante a fase de contração como na de relaxamento. Uma segunda amostra de alcalóide MMIQ foi necessária, e com ela, numerosos experimentos foram realizados. Os resultados obtidos nos levaram a proceder análise espectrofotométrica dessas soluções. Constatamos então, que estas soluções feitas com a nova amostra tinham concentração muito abaixo do esperado. Por isso vários experimentos foram executados corrigindo-se a concentração, isto é, multiplicando-se os volumes adicionados ao banho por um fator de correção.

I. Efeito Inibitório Residual dos A.B.I.Qs.

O efeito inibitório dos cinco alcalóides, constatado desde os primeiros experimentos, foi estudado através da cinética de recuperação da capacidade contrátil de preparação pelo agonista CBC, em três situações diferentes:

1. Situação de equilíbrio para os antagonistas:

Para essa situação experimental foram empregadas curvas dose-efeito cumulativas, possíveis em presença

de indometacina (IDMTC) ($1,3 \times 10^{-6}$ M) após 15 a 30 minutos do contato, realizando-se vários estímulos mecânicos para detecção do bloqueio.

O CBC foi administrado cumulativamente em volumes que não ultrapassaram dois centésimos do volume total do banho. Cada dose sucessiva do agonista, correspondendo ao dobro da dose previamente colocada (fator 2), era adicionada somente quando a resposta à dose precedente já tivesse alcançado o equilíbrio constatado pela horizontalização do registro.

Após obtenção da curva dose-efeito cumulativa, a preparação era lavada exaustivamente, e somente após relaxamento até a linha de base, o alcalóide era adicionado ao banho na dose maior ($7,2 \times 10^{-5}$ M), mantendo-se em incubação durante 30 ou 60 minutos.

Decorrido o tempo de incubação pré-estabelecido, repetia-se a mesma sequência experimental para obtenção da primeira curva dose-efeito cumulativa. Como o intuito desse experimento era analisar a capacidade contrátil da preparação em presença do alcalóide, os resultados foram expressos em função da contração máxima ao agonista antes da administração do alcalóide. Os valores assim obtidos, foram lançados graficamente, porcentagem de resposta em ordenadas e log da concentração molar do CBC em abcissas.

2. Situação de não equilíbrio para os alcalóides e para o agonista

Esses experimentos foram realizados usando-se dose única de CBC em torno de $5,5 \times 10^{-8}$ M. Após incubação com um dos A.B.I.Qs. durante 20 ou 40 minutos na dose maior ($7,2 \times 10^{-5}$ M) o CBC era re-introduzido no banho perfusor nos tempos 0,60 e 120 minutos. Para essas observações padronizamos, as lavadas que foram repetidas no mínimo 5 vezes, adicionando-se a dose seguinte do CBC pós relaxamento completo da preparação registrando-se seu efeito até atingir o equilíbrio.

3. Situação de equilíbrio para o agonista

Para o estudo da recuperação da capacidade contrátil da preparação em ausência dos alcalóides, o líquido perfusor era trocado depois de 30 ou 60 minutos de incubação com os A.B.I.Qs.. Mantivemos o CBC na mesma concentração no líquido nutritivo de tal forma que a supressão do alcalóide era simultânea com a re-introdução do CBC na concentração em que já existia na cuba perfusora. A solução de Krebs com CBC era renovada a intervalos de um minuto por três vezes consecutivas, tão logo a resposta contrátil se estabilizava. Nos momentos anteriores a essas trocas e eventualmente também depois delas é que procedíamos a coleta de amostras do líquido nutritivo para determinação das variações da concentração dos alcalóides.

J. Variações da Concentração dos A.B.I.Qs. durante os Experimentos

Para a determinação precisa da concentração real de um dos alcalóides em determinado instante no transcurso de um experimento realizaram-se análises espectrofotométricas no comprimento de onda correspondente ao pico máximo de absorção conforme já determinado previamente para a obtenção dos valores dos pK_a s.

A análise da concentração dos alcalóides "in vitro" era realizada em associação com o desenvolvimento experimental descrito no item H.3 "Situação de equilíbrio para o agonista". Aliquotas do líquido nutritivo colhidas na cuba perfusora, no instante seguinte à introdução do alcalóide ao banho e também após 60 minutos de incubação, eram lidas imediatamente ou mantidas em geladeira (aproximadamente 4°C) até o dia seguinte. As soluções recém-preparadas dos alcalóides eram também submetidas a análise confirmativa espectrofotométrica de suas concentrações. Toda vez que surgia situação de equilíbrio com horizontalização do traçado colhíamos nova amostra e a seguir lavávamos a preparação por mais duas vezes.

RESULTADOS

I. DETERMINAÇÃO DOS pK_a s DOS ALCALÓIDES BENZIL-ISOQUINOLÍNICOS.

As Figuras 2, 3, 4, 5 e 6 mostram os espectros de absorção no intervalo de 220 a 270 μ m para os alcalóides, nos valores de pH indicados sobre as curvas, usando-se as soluções-tampão descritas em "métodos".

Observamos que para o PAV-OH e para a NO_2 -PAV não se registraram pontos isobésticos bem definidos. Nestes casos os pontos escolhidos (Tabela 1) para cálculo obedeceram a regra da maior probabilidade. O mesmo ocorreu com as nossas primeiras determinações espectrais da PAV, que, entretanto após purificação por dissolução fracionada permitiu obtenção de traçado adequado.

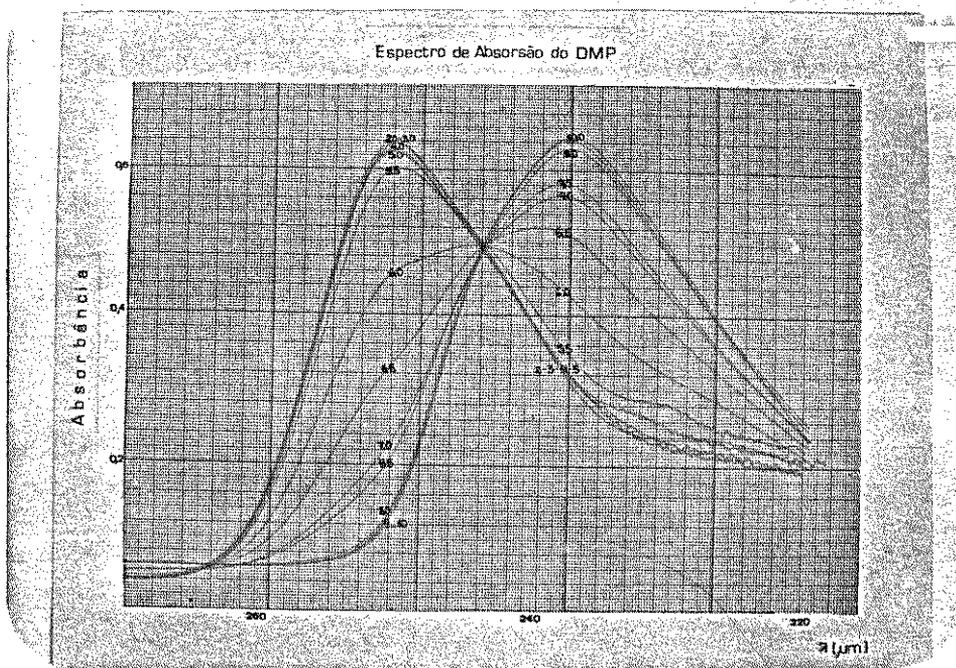
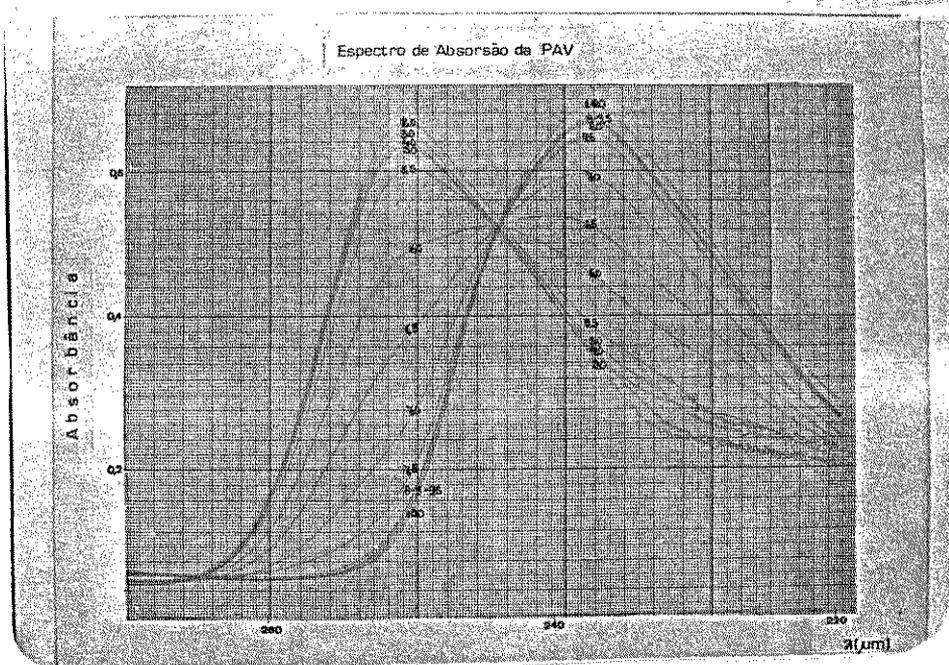
Na Figura 4 observamos que a escala de ordenadas foi expandida, consequência do maior coeficiente de extinção molar para o MMIQ.

Na determinação dos espectros as concentrações M dos alcalóides foram: PAV $1,35 \times 10^{-5}$; DMP $1,1 \times 10^{-5}$; MMIQ $5,0 \times 10^{-6}$; PAV-OH $1,0 \times 10^{-5}$ e NO_2 -PAV $1,0 \times 10^{-5}$.

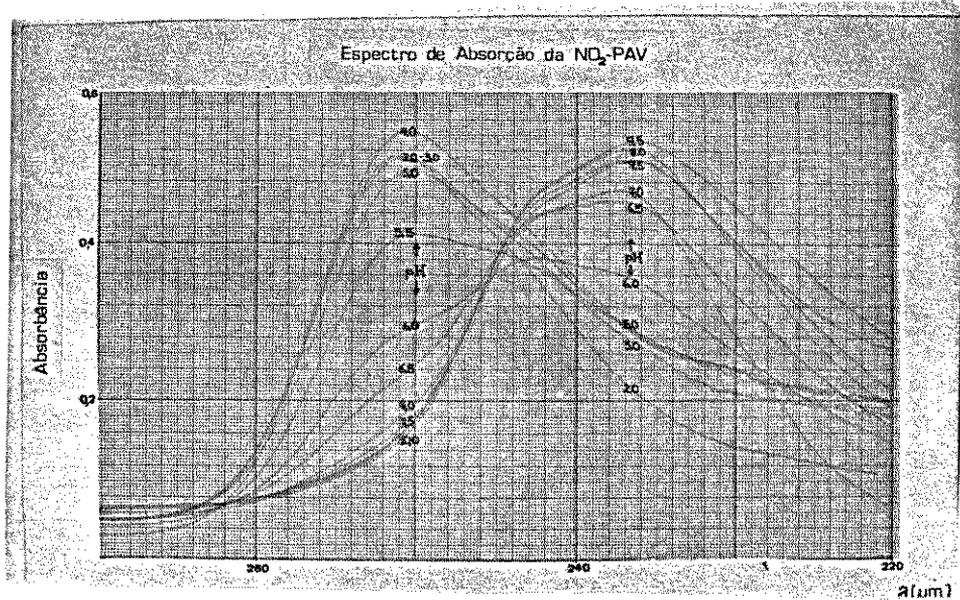
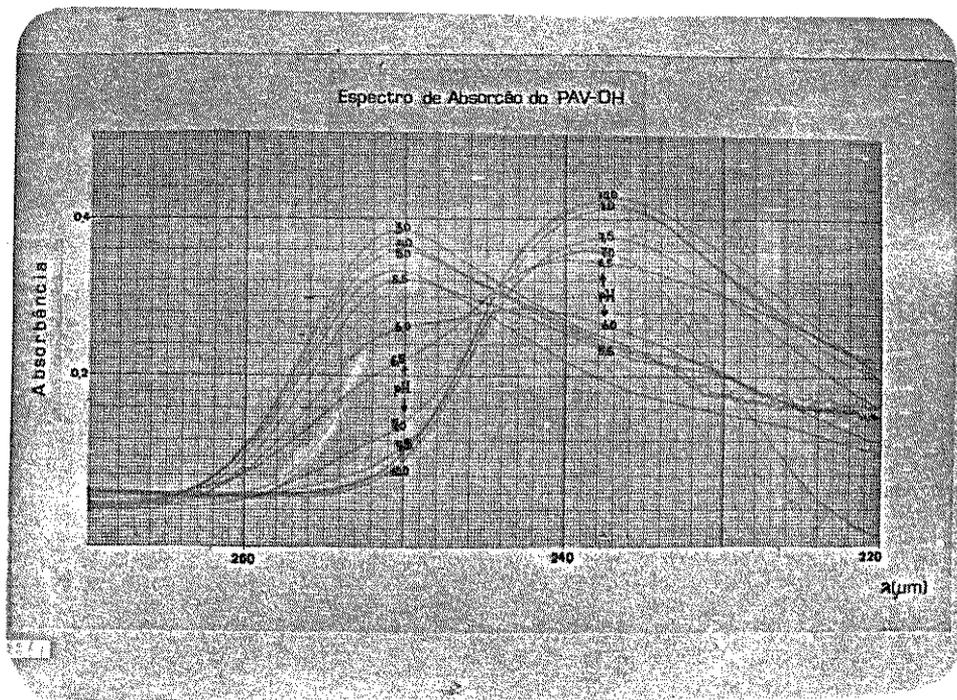
Os dados espectrais obtidos foram reunidos na Tabela 1 e usados na determinação dos pK_a s. A Tabela 2 mostra estes valores, determinados por dois processos diferentes.

A Figura 7 mostra a determinação, pelo método gráfico, dos pK_a s para o DMP e para a NO_2 -PAV.

Os valores de comprimento de onda e de coeficiente de extinção molar obtidos em pH 7,4 (Tabela 1) foram os utilizados na determinação da concentração de cada alcalóide no líquido perfusor, a partir de amostras colhidas por meio de pipetas automáticas nos pontos indicados nas Figuras 8, 9, 10, 11 e 12.



Figs. 2 e 3 - Os cloridratos de PAV e da DMP foram dissolvidos em água, na concentração de $1,35 \times 10^{-5}$ M e $1,1 \times 10^{-5}$ M, respectivamente.



Figs. 4 e 5 - Os cloridratos de PAV-OH e NO₂-PAV foram dissolvidos em água na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ M.

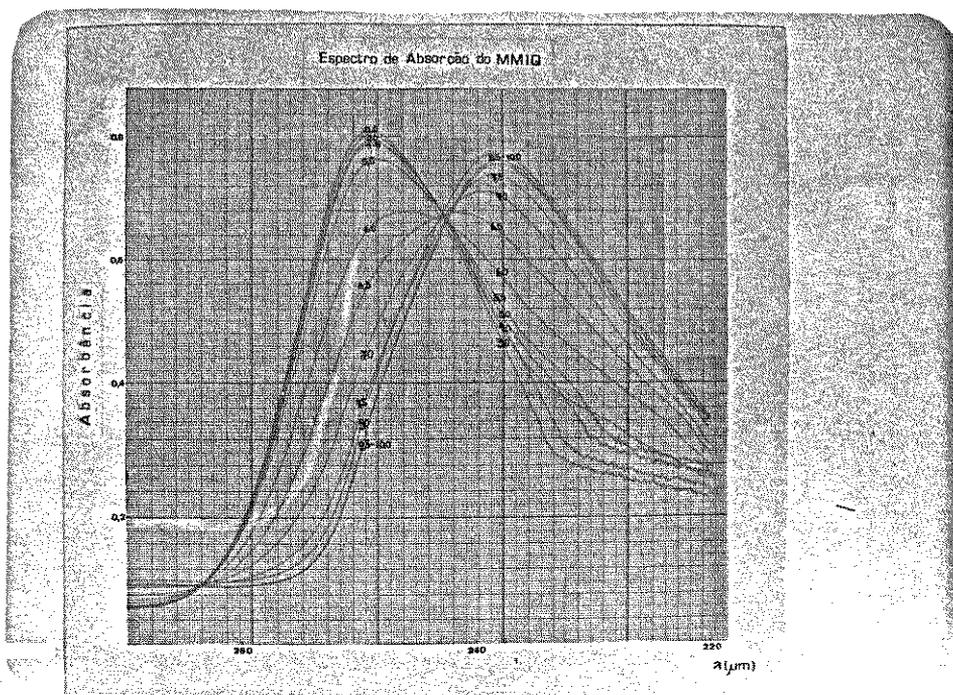


Fig. 6 - O cloridrato do MMIQ foi dissolvido em água na concentração de 5×10^{-6} M.

Pontos chave nos espectros de absorção dos A. B. I. Qs.
(λ em μm)

	P A V		D M P		M M I Q		P A V - O H		N O ₂ - P A V	
	ϵ	λ	ϵ	λ	ϵ	λ	ϵ	λ	ϵ	λ
FORMA máx. MOLECULAR	51.185	237,5	58.545	239,0	152.000	239,0	41.000	237,0	53.500	236,0
mín.	9.185	250,5	14.545	250,0	65.000	248,5	9.800	251,0	15.000	251,0
FORMA máx. IÔNICA	49.481	250,5	57.454	250,0	163.000	248,5	39.100	251,0	51.000	251,0
mín.	26.666	237,5	30.909	239,0	100.000	239,0	24.000	237,0	22.000	236,3
Pto. ISOBÉSTICO	38.666	244,0	44.090	244,0	133.000	243,0	31.400	244,0	41.400	244,0
PH = 7,4	47.851	237,5	52.727	239,0	152.000	239,0	38.000	237,0	51.000	236,3

Tabela 1 - Variação dos valores de ϵ e nos dois picos de máxima absorção e no ponto isobéstico, para cada alcalóide. Os valores de ϵ obtidos no pH 7,4 foram utilizados para cálculo das concentrações reais dos alcalóides no líquido perfusor.

Determinação do pK_a da Papaverina - Método Matemático

O espectro de absorção (Fig. 2) mostra que em solução ácida há máxima absorção para comprimento de onda de 250,0 μm . A medida que a solução torna-se mais alcalina aumenta a absorção para comprimento de onda crescente, atingindo um pico máximo em 239,0 μm , que corresponde a absorção do composto na forma não ionizada. O espectro apresenta também um ponto isobéctico para comprimento de onda de 244,0 μm .

Para obtenção do valor de pK_a da papaverina, selecionamos o comprimento de onda onde ocorre o pico máximo do composto na sua forma iônica, que corresponde a 250,0 μm . O ϵ da papaverina na forma iônica corresponde a 49.481 no pico máximo de absorção.

pH	A	ϵ	$ \text{BH}^+ \times 10^{-5}$	$ \text{B} \times 10^{-5}$	$ \text{H}^+ \times 10^{-7}$	$K \times 10^{-7}$
2,0	0,668	49.481				
3,0	0,652					
4,0	0,640					
5,0	0,632					
5,5	0,600		1,214	0,140	31,6	3,7
6,0	0,484		0,918	0,436	10,0	4,8
6,5	0,368		0,625	0,720	3,16	3,7
7,0	0,254		0,334	1,011	1,00	3,0
7,5	0,160					
8,0	0,144					
9,0	0,140					
9,5	0,130					
10,0	0,124	9.185				

$$K = 3,8 \times 10^{-7}$$

$$pK = -\log K$$

$$\text{Portanto } pK_a = 6,4 \text{ e } pK_b = 7,6$$

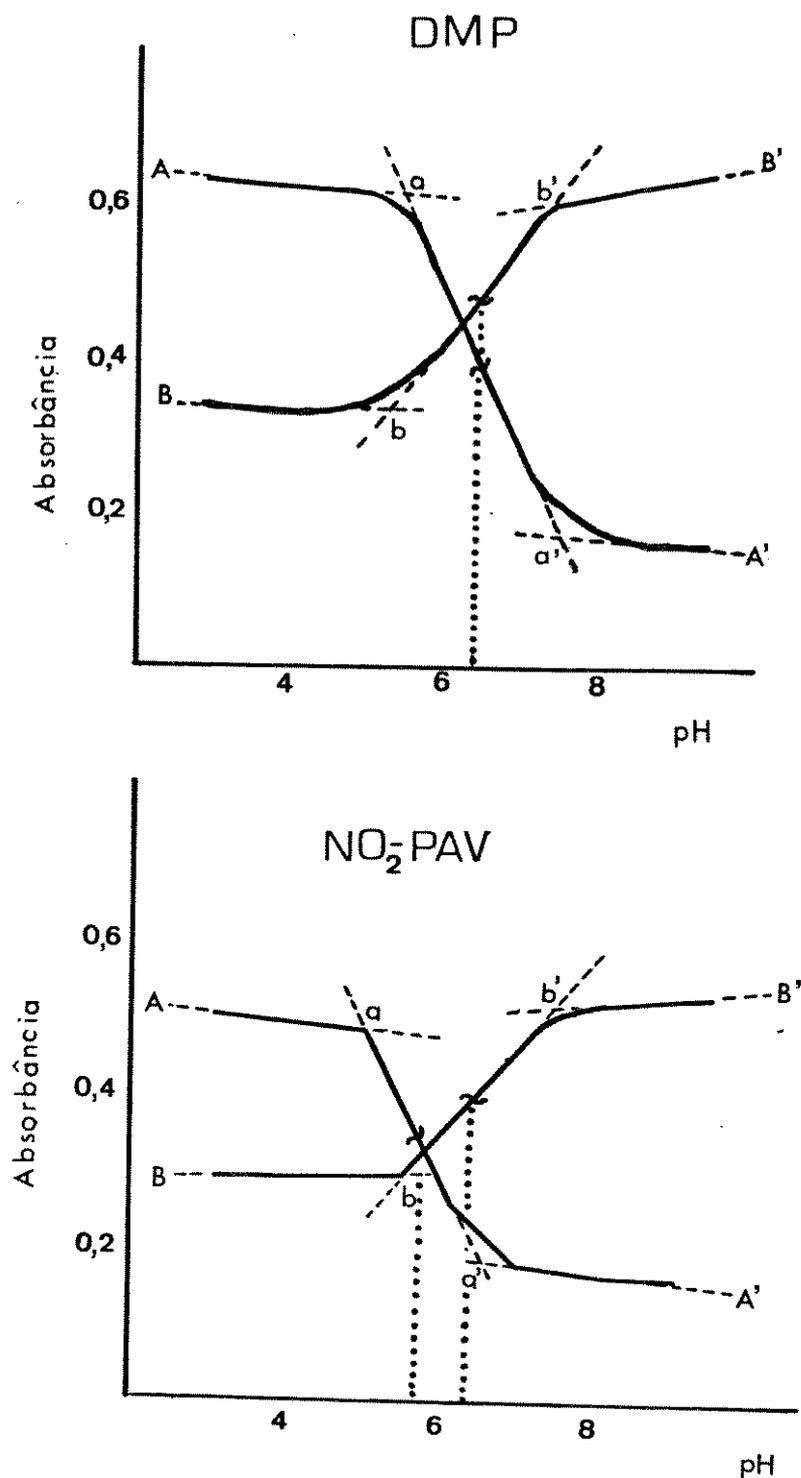


Fig. 7 - Determinação dos pK_a do DMP e NO_2 -PAV pelo método do gráfico. As absorbâncias nos pontos de máxima são lançados graficamente contra pH, originando as curvas AA' e BB'. As tangentes aos 4 segmentos horizontais e 2 oblíquos delimitam os segmentos $\overline{aa'}$ e $\overline{bb'}$. O ponto médio desses segmentos, projetado verticalmente define na abcissa o(s) valor(es) do(s) pK_a (s).

VALORES DE pK_a PARA OS ALCALÓIDES
BENZIL-ISOQUINOLÍNICOS

Alcalóide	método gráfico	método matemático
PAV	6,4	6,4
DMP	6,3	6,3
MMIQ	6,3	6,3
PAV-OH	6,4	6,4
NO ₂ -PAV	5,8 e 6,4	-

Tabela 2 - Valores de pK_a para os cinco alcalóides obtidos pelos métodos gráfico e matemático. Os dois valores da NO₂-PAV correspondem a seus dois grupos ionizáveis.

II. CINÉTICA DE RELAXAMENTO E RECUPERAÇÃO DA CAPACIDADE DE CONTRAÇÃO AO CARBACOL

As Figuras 8, 9, 10, 11 e 12 mostram as respostas a uma dose sub-máxima de CBC e a cinética de relaxamento por um dos alcalóides, sempre na concentração de $1,8 \times 10^{-5}M$, até definição do efeito máximo. A partir de 60 minutos de contato da preparação com o alcalóide, estas figuras mostram como se processa, no tempo, a recuperação da capacidade de responder ao CBC, mantido no líquido perfusor, exatamente na mesma concentração, ao longo de todo o experimento. Observamos que às sucessivas lavadas da preparação há coincidência entre a retomada da contração, com a diminuição da quantidade do alcalóide no banho. As concentrações molares médias, medidas espectrofotometricamente estão colocadas nos retângulos e correspondem a amostras colhidas do banho perfusor com auxílio de pipetas automáticas, nos pontos indicados pelas setas. Estas estão situadas sob a marca W indicando que o líquido colhido neste ponto esteve em contato com a preparação desde a marca W imediatamente anterior até este local. O alcalóide foi adicionado ao banho alguns minutos após obtenção do efeito máximo ao CBC, conforme indicado pela flexa.

Na Figura 8 observamos que a PAV produz, nessa concentração, efeito miorelaxante intenso, que se manifesta logo ao contato com a preparação e que se com

pleta cerca de 20 minutos depois desse contato. Ainda as sim, a papaverina foi mantida no banho por mais de 40 mi nutos, quando então se inicia a fase de análise da recu peração. Observar que a quantidade de papaverina adicio nada ao banho diminui de 180 para 150 nanomoles após 10 minutos e que nos 60 minutos de incubação cerca de 60 na nomoles do alcalóide foram "gastos".

A quantidade de PAV detectável logo após a dupla substituição do líquido perfusor por outro igual, porém isento do alcalóide foi de 5 n moles. Observamos que nos 20 minutos seguintes houve recuperação de aproxi madamente 36% da resposta ao CBC enquanto que foram encontrados cerca de 20 n moles de PAV. Para recuperação de 65% o valor medido do alcalóide foi também de 20 n mo les. Depois de 70, 90 e 110 minutos da retirada da PAV do banho as recuperações percentuais foram respectivamen te de 70, 78 e 83, para as quais foram encontrados pela ordem, 10, 9 e 4 nanomoles de PAV no banho.

A Figura 9 mostra os resultados do mesmo tipo de experimento feito com a DMP observamos início tam bém imediato do relaxamento pelo alcalóide, efeito miore laxante de 100% depois de 40 minutos, recuperação de aproximadamente 44, 67 e 77% da resposta contrátil nos tempos de 50, 90 e 110 minutos em ausência do DMP. Dos 180 n moles deste alcalóide existentes no banho perfusor logo após o 30º minuto de experimento, cerca de 50 n moles não puderam ser detectados depois de 60 minutos de incubação. Observamos o fato importante de que nada me-

nos de 18 n moles permaneceram no banho perfusor depois de substituição por duas vezes usando-se "Krebs-CBC" . Seguem-se os valores de 13, 12 e 10 n moles, quando a preparação já não mais acrescenta contração a subsequentes lavadas.

A Figura 10 ilustra o comportamento da preparação frente ao MMIQ. Podemos observar que o efeito máximo quanto ao relaxamento perfaz cerca de 91%, embora se inicie tão logo da sua adição ao banho. Por outro lado se constata que o equilíbrio é também rapidamente atingido, já aos 10 minutos, em relação a quantidade de MMIQ no banho perfusor. Em particular, com o uso desse alcalóide, a recuperação foi mais baixa, correspondendo aproximadamente a 65% dos 110 n moles do MMIQ que permaneciam no banho após 60 minutos de incubação.

O PAV-OH produziu (Figura 11) relaxamento máximo de aproximadamente 87% já após 30 minutos de contato com a preparação. Dez minutos depois da adição do alcalóide e relaxamento era de quase 70% embora a análise espectrofotométrica de uma amostra do líquido perfusor coletada nesse ponto não tenha revelado variação na quantidade de PAV-OH. Completados os 60 minutos de incubação, cerca de 30 n moles do alcalóide permaneciam forra do líquido perfusor. A recuperação foi de 100% depois de aproximadamente 70 minutos da mudança para o "Krebs-CBC". Depois de 60 minutos de incubação com o PAV-OH foram determinados cerca de 150 n moles no banho. A recuperação total quando a recuperação era de

100% correspondia a cerca de 37 n moles, nos 10 ml do banho.

Finalmente, a NO_2 -PAV (Figura 12) produziu seu efeito miorelaxante máximo de aproximadamente 50% a pós 50 minutos e recuperação completa, isto é, de 100%, também depois de 50 minutos da supressão do alcalóide do líquido nutritivo. Depois dos 60 minutos de incubação puderam ser detectados apenas 60 n moles no banho. A recuperação conseguida até o final do experimento somou apenas cerca de 35 n moles.

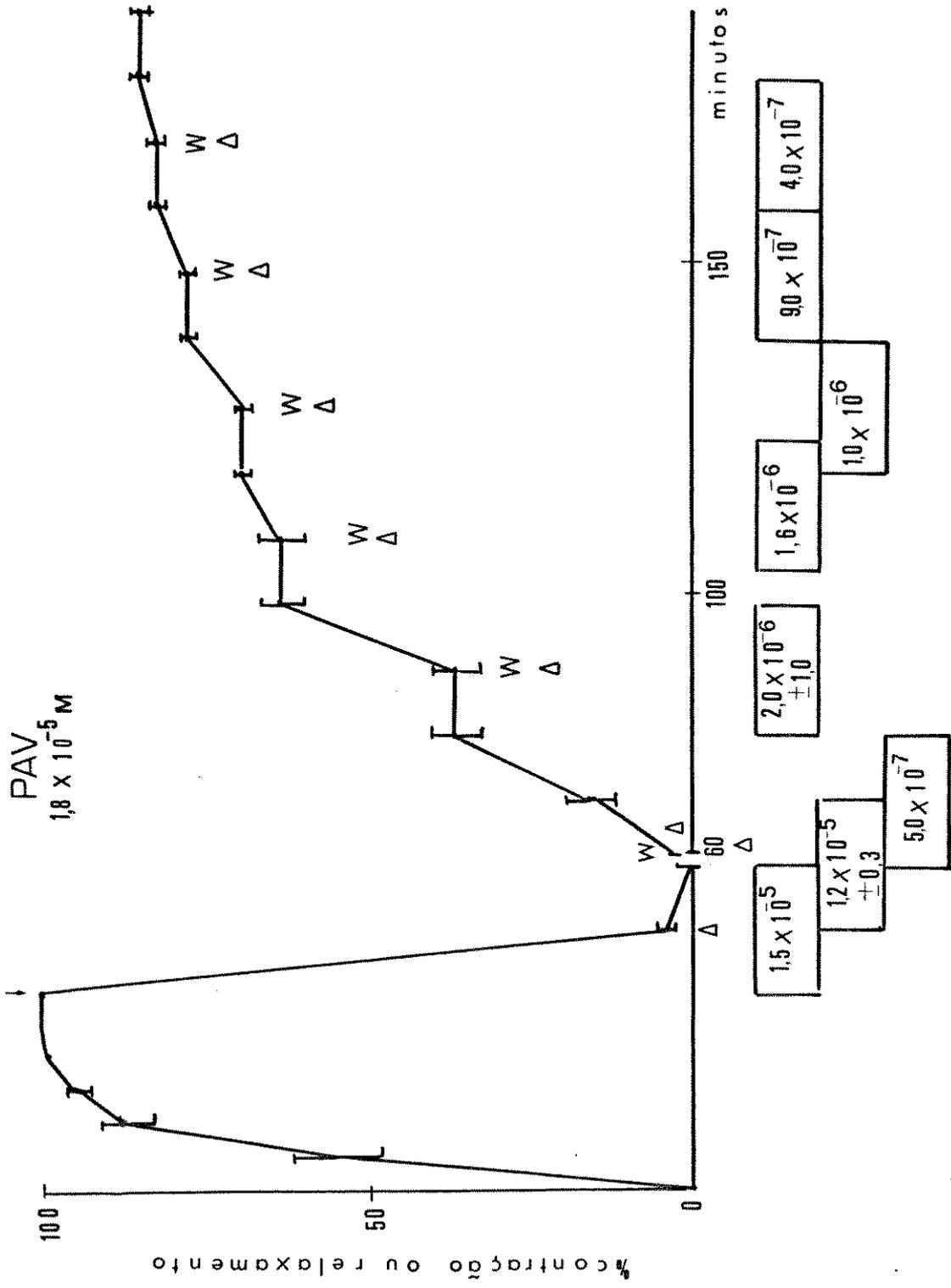


Fig. 8 - Resultado médio de três experimentos registrando a contração ao CBC, relaxamento à PAV e a recuperação da capacidade contrátil. W indica duas lavadas da preparação com "Krebs-CBC". Nos retângulos, a concentração molar do alca-
lóide no banho, nos tempos indicados pelas setas.

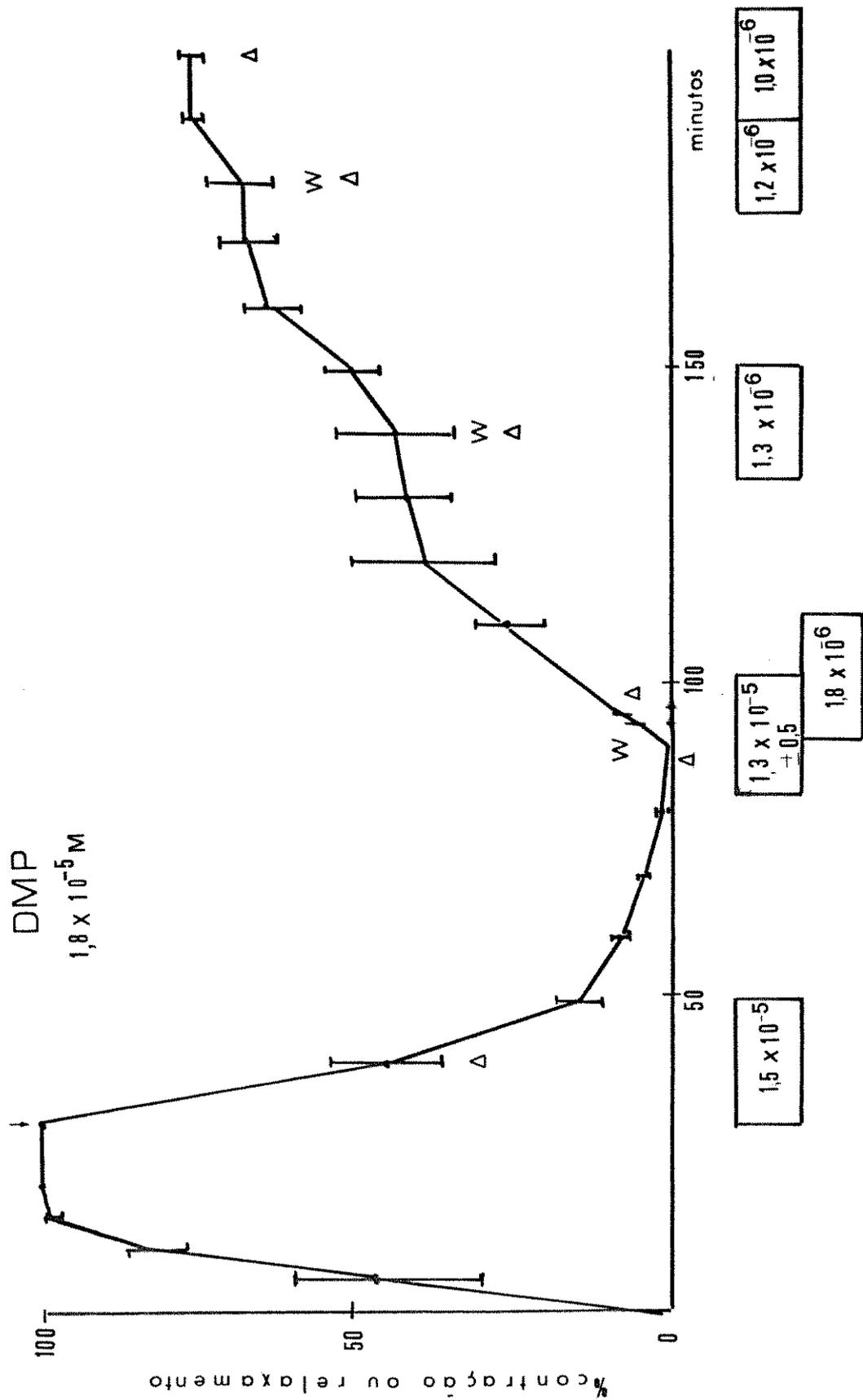


Fig. 9 - Resultado médio de três experimentos registrando a concentração ao CBC, relaxamento pelo DMP e a recuperação da capacidade contrátil. W indica duas lavagens da preparação com "Krebs-CBC". Nos retângulos, as concentrações molares do alcalóide no banho, nos tempos indicados pelas setas.

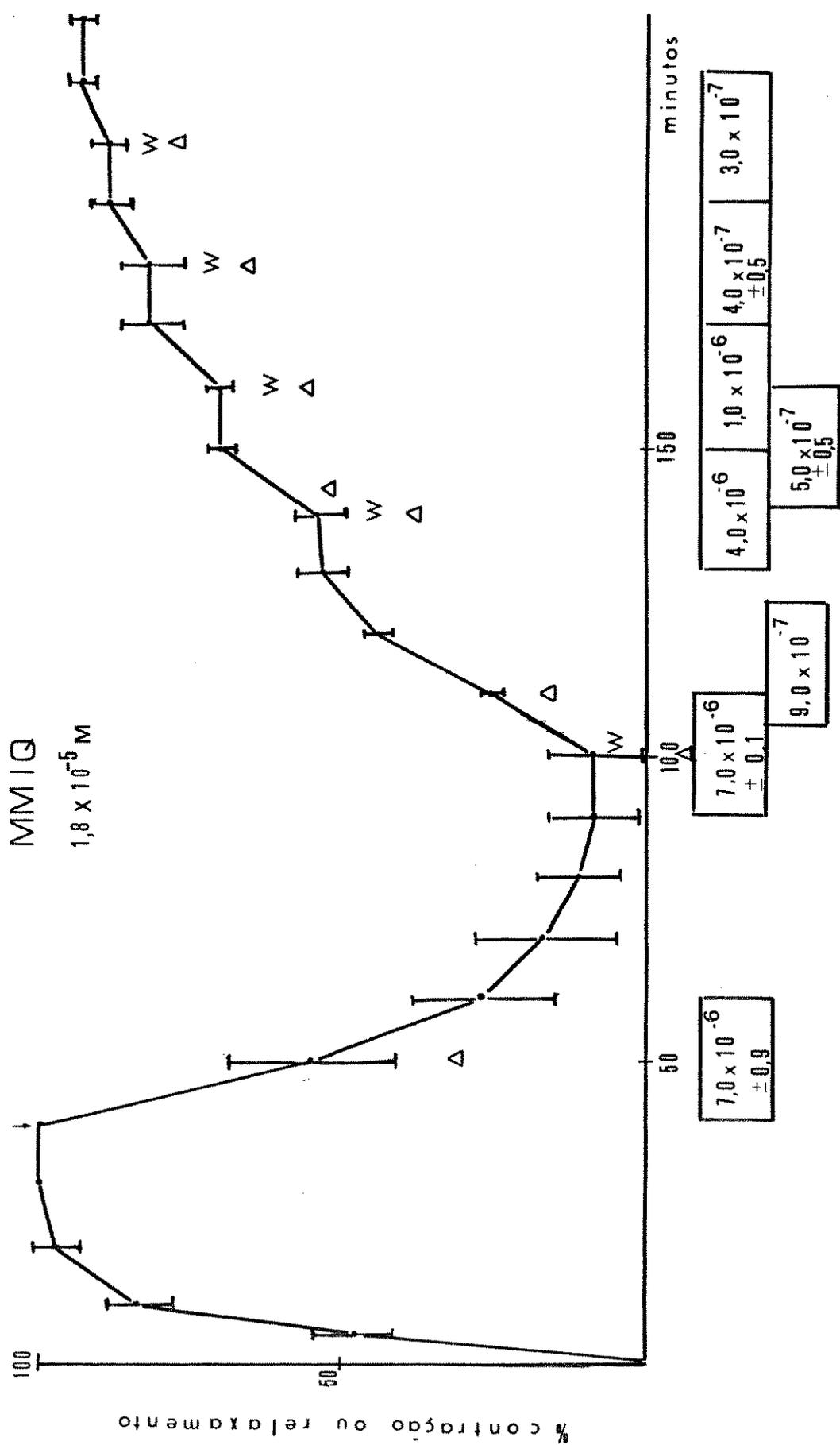


Fig. 10 - Resultado médio de três experimentos registrando a contração ao CBC, relaxamento pelo MMIQ e a recuperação da capacidade contrátil. W indica duas lavadas da preparação com "Krebs-CBC". Nos retângulos, os valores das contrações molares do alcalóide no banho, nos tempos indicados pelas setas.

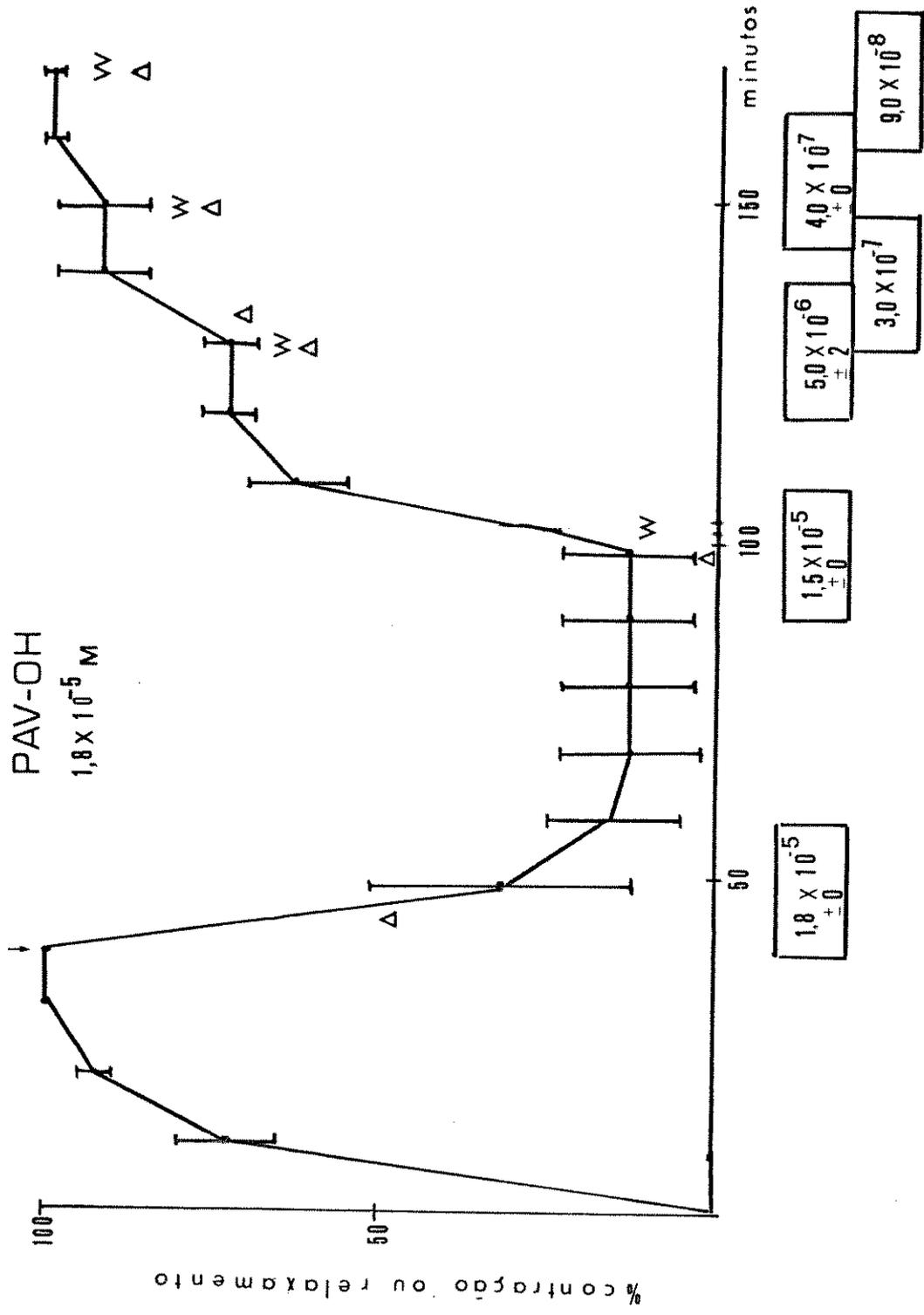


Fig. 11 - Resultado médio de três experimentos registrando a contração ao CBC, relaxamento pela PAV-OH e a recuperação da capacidade contrátil. W indica duas lavagens da preparação com "Krebs-CBC". Nos retângulos, as concentrações molares do alcalóide no banho, nos tempos indicados pelas setas.

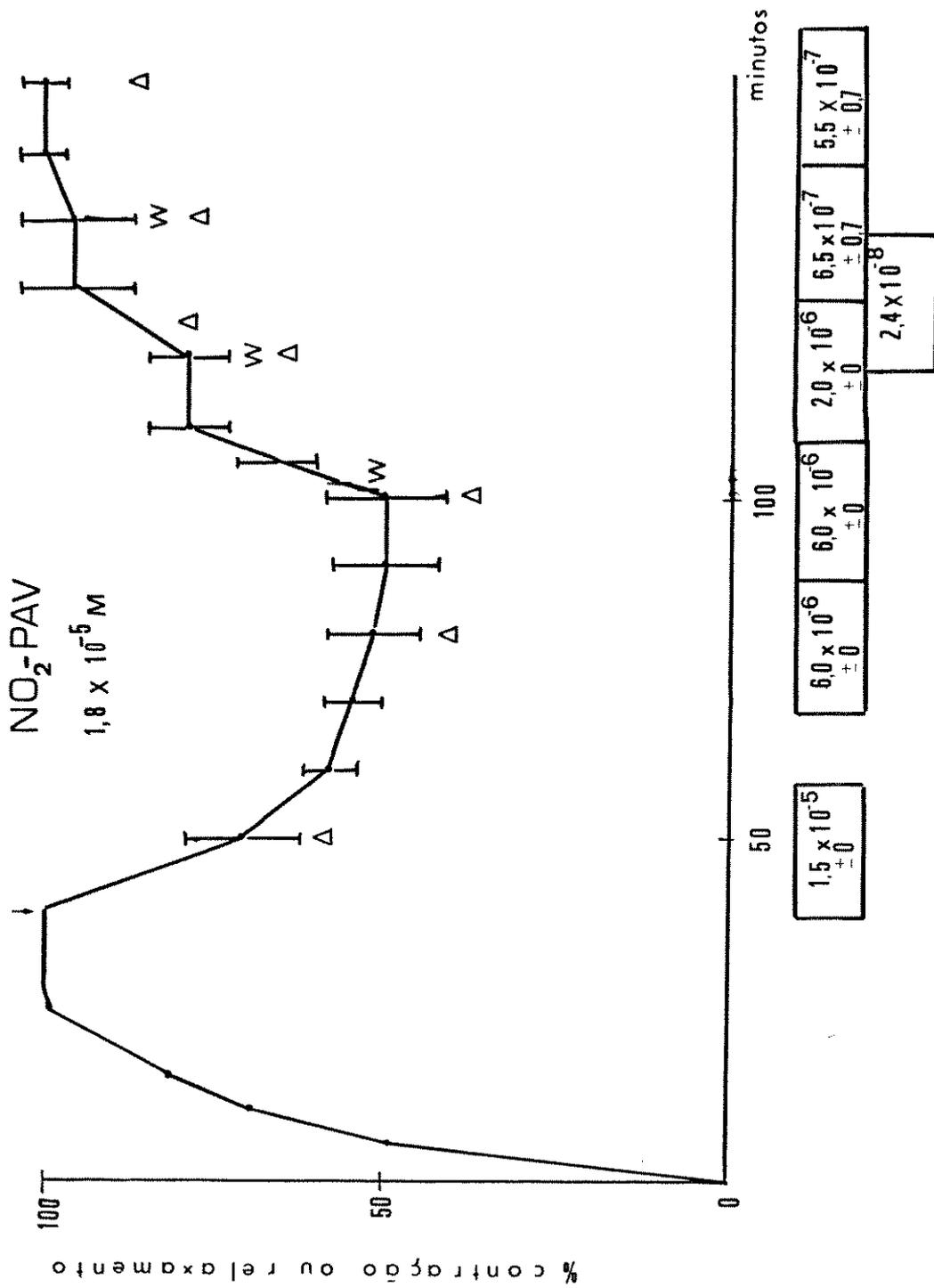


Fig. 12 - Resultado médio de três experimentos registrando a contração ao CBC, relaxamento pelo NO₂-PAV e a recuperação da capacidade contrátil. W indica duas lavadas da preparação com "Krebs-CBC". Nos retângulos a concentração molar dos alcalóides no banho, nos tempos indicados pelas setas.

III. MEDIDA DA ATIVIDADE ESPAMOLÍTICA PRODUZIDA POR DUAS DOSES DIFERENTES DE ALCALÓIDES

As Figuras 13 e 14 mostram os efeitos espamolíticos máximos atingidos nos tempos indicados, para as doses de 1,8 e $7,2 \times 10^{-5}$ M. Podemos observar que a PAV produziu efeito máximo já aos 20 minutos com dose pequena (P) e que esse tempo não se reduziu com a dose grande (G). A NO_2 -PAV atingiu um máximo de 48% de relaxamento, após 40 minutos com a dose P e 67% aos 30 minutos com a dose quatro vezes maior. Revela-se o menos potente neste teste. Quanto a ação do MMIQ, esta é válida apenas para a dose P, face a discrepância entre a dose supostamente usada e a verificação espectrofotométrica. Esse problema afetou apenas os experimentos com dose alta que, por isso, diferem pouco da dose P. Assemelha-se portanto, quanto à potência, ao PAV-OH. Com ressalva já feita, essa mesma comparação parece valer também para a dose maior. O DMP atingiu 100% de relaxamento tanto com a dose maior como com a menor, aos 30 e aos 50 ou 60 minutos respectivamente. Esses diagramas de barras permitem observar com clareza certas analogias e diferenças. Assim, verificamos que com a dose maior a NO_2 -PAV tem não apenas potência semelhante, como acompanha estritamente o efeito do MMIQ (na concentração não corrigida). Já a comparação entre PAV-OH e DMP permite verificar que existe até inversão de posição, isto é, com dose P o

DMP a partir dos 20 minutos parece algo mais poderoso que o PAV-OH, enquanto que com a dose G este último também alcança 100% de efeito já aos 10 minutos, valor alcançado pelo DMP só entre 20º e 30º minutos. Com esta dose G o PAV-OH acompanha de perto a atividade miorelaxante da PAV, o que não ocorre para dose P, principalmente no início do experimento.

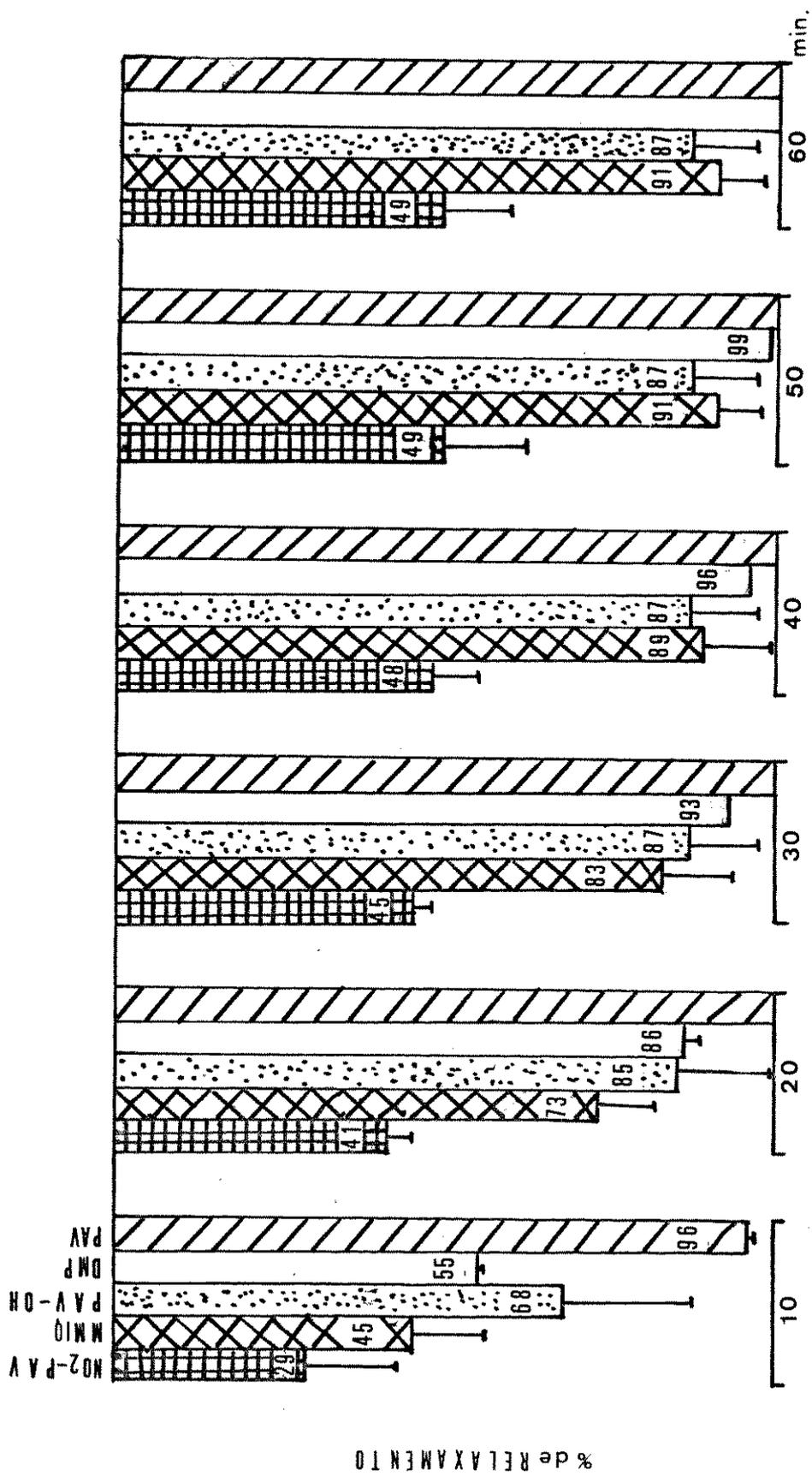


Fig. 13 - Diagrama demonstrativo das atividades espasmolíticas dos cinco alcalóides na concentração de 1.8×10^{-5} molar, nos tempos indicados.

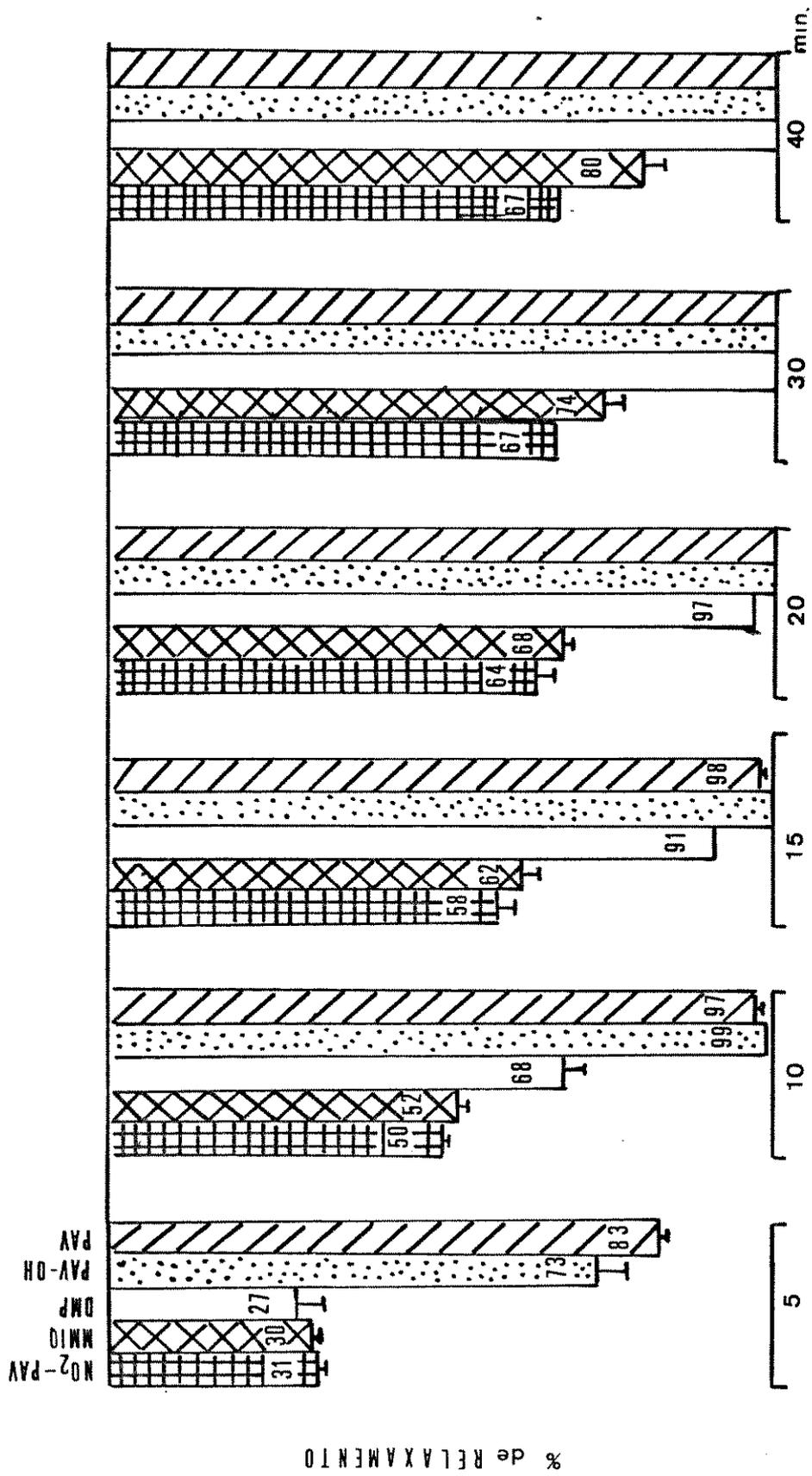


Fig. 14 - Diagrama demonstrativo das atividades espasmolíticas dos cinco alcalóides na concentração de $7,2 \times 10^{-5}$ molar, nos tempos indicados.

IV. INIBIÇÃO RESIDUAL DOS ALCALÓIDES BENZIL-ISOQUINOLÍNICOS EM DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO, AVALIADA PELO CBC EM DOSE SIMPLES, NA MESMA CONCENTRAÇÃO.

A Figura 15 mostra, diagramaticamente, os resultados obtidos após incubação de 20 ou 40 minutos com cada alcalóide na vigência de contração sub-máxima ao CBC. Decorridos esses tempos, o alcalóide e o agonista são retirados e a preparação inicia seu relaxamento que é completado pela adição do isoproterenol (IS), sempre na dose de 4×10^{-7} M. Seguem-se sistematicamente três lavadas da preparação e logo se repete o CBC para a primeira observação, que corresponde ao tempo zero no nosso diagrama. Aos 60 e aos 120 minutos repetem-se as operações a partir do IS, sempre com o CBC exatamente na mesma concentração.

Observamos portanto que nestas condições existe sempre um efeito residual que é tempo dependente, isto é, preparações após 40 minutos de contato com um mesmo alcalóide benzil-isoquinolínico dão menores respostas ao CBC em relação às que ficaram incubadas por apenas 20 minutos. Observamos também que a PAV, que se revela mais potente sob outras condições é o que deixa maior efeito residual, seguido pelo DMP e PAV-OH que a sucedem ordem decrescente de potência espamolítica. Os resultados com o MMIQ não são conclusivos, face ao problema do uso de doses não corrigidas. A NO_2 -PAV, o me-

nos potente dentre os alcalóides estudados, permite rápida, porém incompleta recuperação.

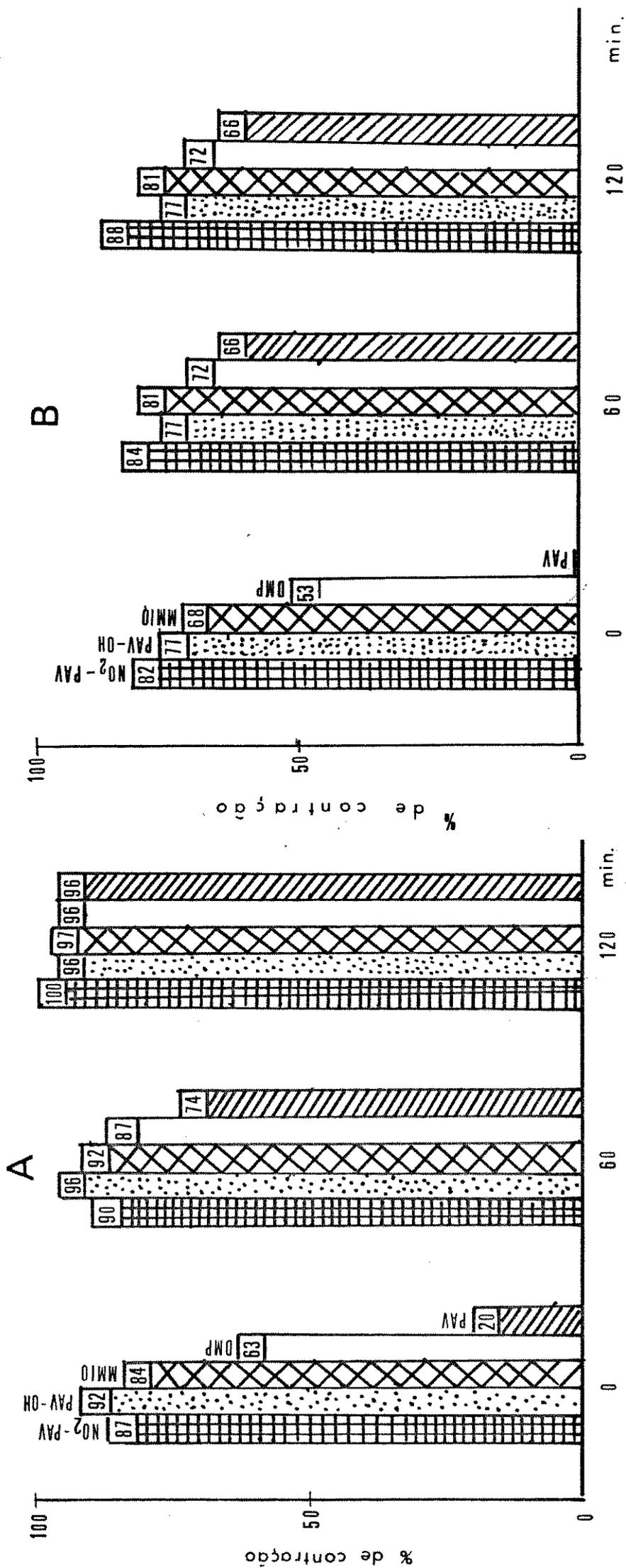


Fig. 15 - Medidas do efeito espasmolítico residual dos alcalóides B.I.Qs. na concentração de $7,2 \times 10^{-5}$ M, avaliado pelas respostas contráteis a uma mesma concentração de CBC re-adicionado, em dose simples, nos tempos zero, 60 ou 120 minutos. A supressão dos alcalóides do banho foi feita após 20 minutos de contato (painel A) ou 40 minutos (painel B).

V. RESPOSTAS À ADIÇÃO CUMULATIVA DO CBC EM PRESENÇA DOS ALCALÓIDES BENZIL-ISOQUINOLÍNICOS

A Figura 16 corresponde a um dos registros originais da série de experimentos cujos resultados aparecem nas figuras subsequentes, 18, 19 e 20. Ela mostra uma curva dose-cumulativa x resposta ao CBC e sua repetição após 60 minutos de contato com o PAV-OH ($7,2 \times 10^{-5}$ M), correspondente ao painel B da Figura 18.

A Figura 17 permite constatar as dimensões do "fading", média de 4 determinações, nas quais o intervalo entre duas curvas dose-cumulativas foi o mesmo que quando do uso dos alcalóides, nesta sequência de experimentos.

Na Figura 18 estão representadas experiências com NO_2 -PAV e PAV-OH. Nesta, e nas duas subsequentes, para evitar influência da primeira curva, aos 30 minutos sobre a segunda, foi realizada outra preparação, o par da anterior, na qual houve coincidência das respostas primitivas ao CBC, donde estarem representadas somente três curvas.

Como era de se esperar, em todos os casos houve deslocamento para a direita, aproximadamente paralelo em quase toda a extensão da curva. As medidas desse deslocamento feita sobre o eixo das concentrações são de uma unidade log para a NO_2 -PAV, isto é, a preparação começa a se contrair quando a concentração do CBC é de

5×10^{-8} M, para o DMP com 1×10^{-7} M, para a PAV-OH é 3×10^{-7} M, para o MMIQ 5×10^{-7} M e também para a PAV 5×10^{-7} M.

Ainda nas Figuras 18, 19 e 20 observamos, a nível de 50% do efeito máximo ao CBC, um afastamento de 0,7 unidades log para a direita entre as curvas nos tempos zero e 60 minutos; 1 unidade log para o DMP e também para o PAV-OH, e 1,4 unidades log para o MMIQ.

Entretanto pode se observar que para a PAV esse confronto não pode ser feito com doses equivalentes, já que um fenômeno qualitativamente diverso se manifesta, tanto na curva dos 60 como na dos 30 minutos, simulando uma curva indicativa de antagonismo não competitivo. Partindo da hipótese de que esse fenômeno decorra da maior potência da PAV em relação aos demais alcalóides realizamos o mesmo experimento com dose 8 vezes menor, e o resultado pode ser apreciado no painel B da mesma Figura 20. Nessas condições, para nível de 50% de resposta máxima ao agonista, o afastamento entre as curvas nos tempos zero e 60 minutos é de 0,8 unidades log.

Quanto às diferenças entre as várias curvas nos tempos 30 e 60 minutos constatamos, com uma única provável exceção, que não há entre elas diferença que esteja fora dos limites atribuíveis ao "fading" imposto pelo procedimento experimental, ilustrado na Figura 17.

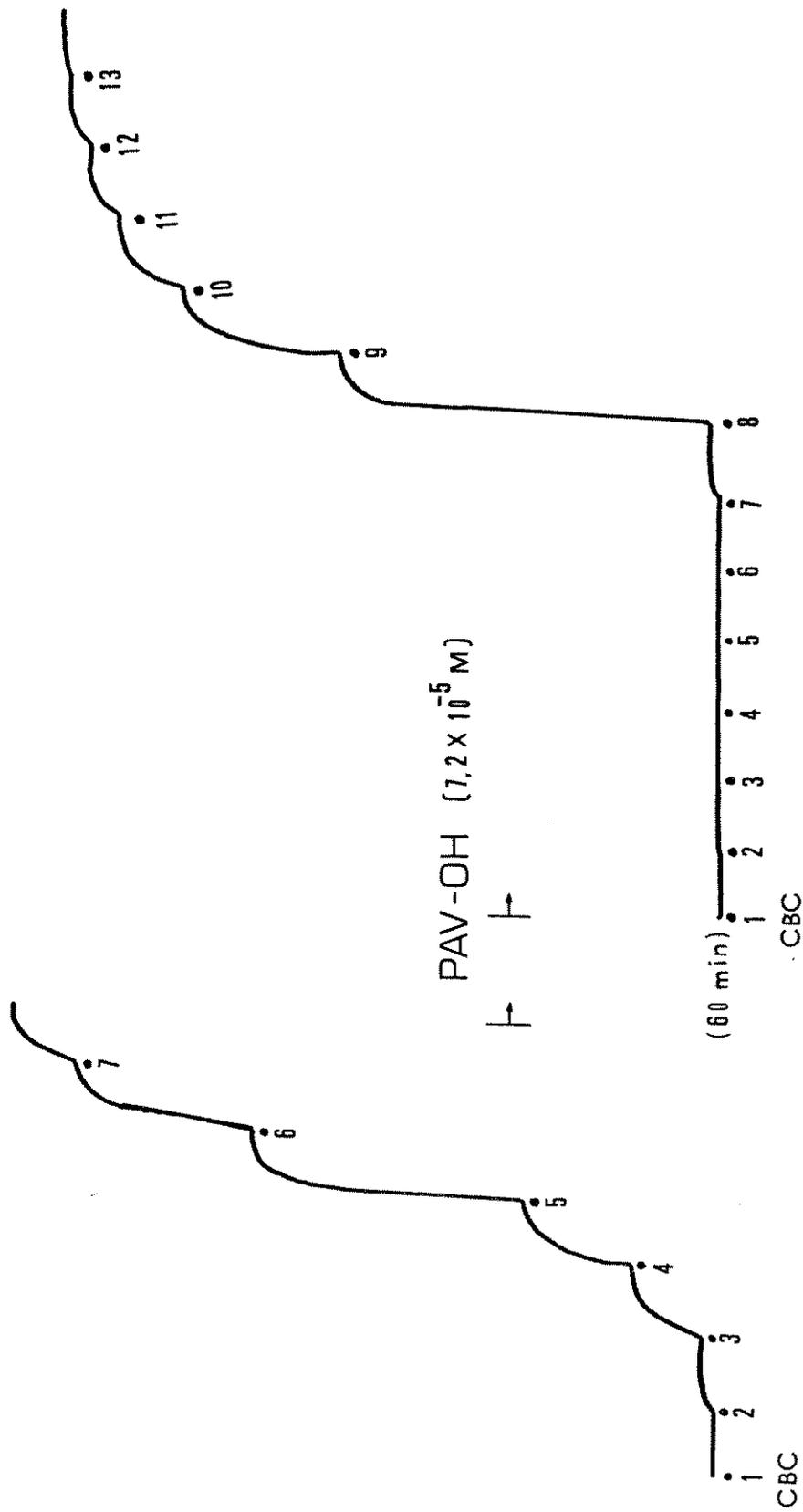


Fig. 16 - Registrograma das respostas cumulativas ao CBC a partir de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$, $f=2$, em ausência e presença de papaverinol. A segunda curva foi realizada após 60 minutos de contato da preparação com o alcalóide.

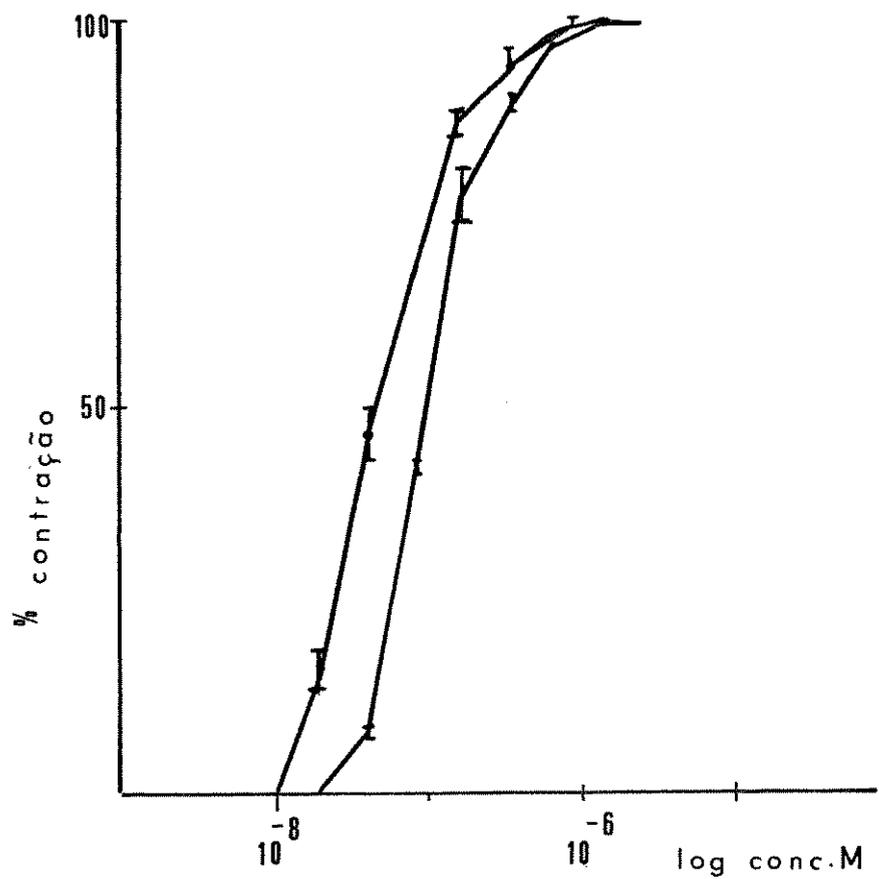


Fig. 17 - Curvas dose-resposta cumulativas ao CBC, construídas com os valores médios de 4 experimentos, nos tempos zero (à esquerda) e após 60 minutos, objetivando obter medida do "fading" do procedimento experimental.

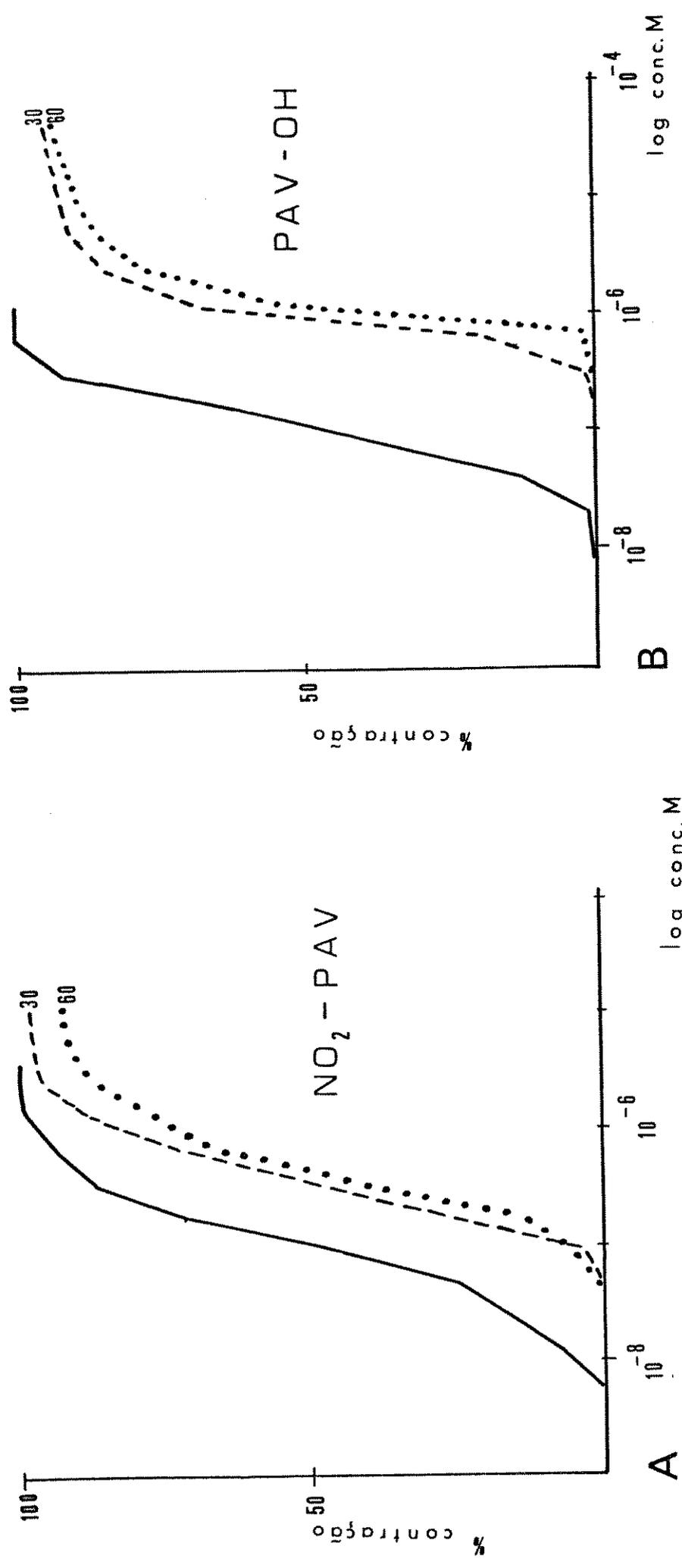


Fig. 18 - Curvas dose-resposta cumulativas ao CBC, em ausência (—) ou presença da nitropapaverina ou do papaverinol, na concentração de $7,2 \times 10^{-5}$ M, após 30 (---) ou 60 (...) minutos.

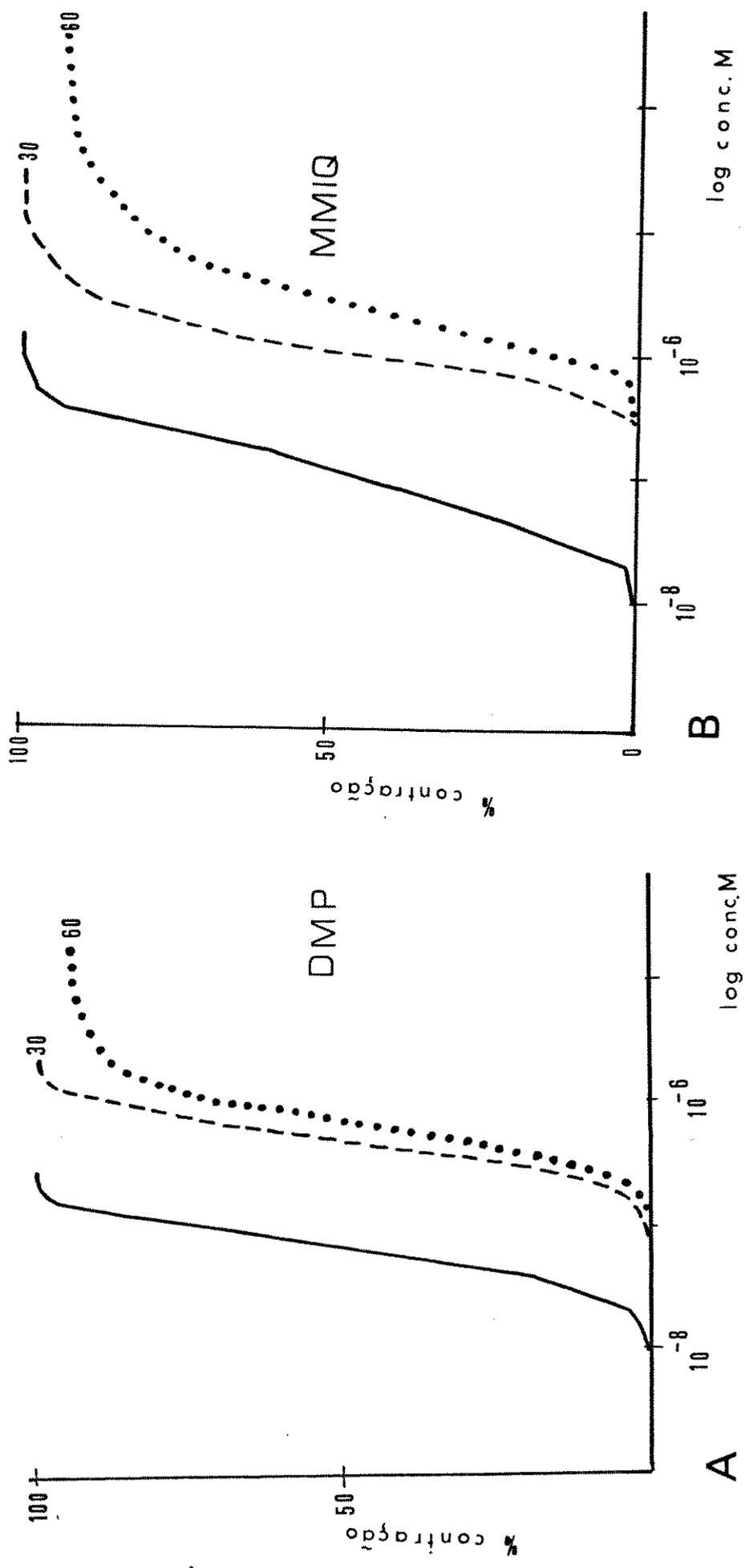


Fig. 19 - Curvas dose-resposta cumulativa ao CBC, em ausência (—) ou presença do DMP ou MMIQ na concentração de $7,2 \times 10^{-5}$ M, após 30 (---) ou 60 (...) minutos.

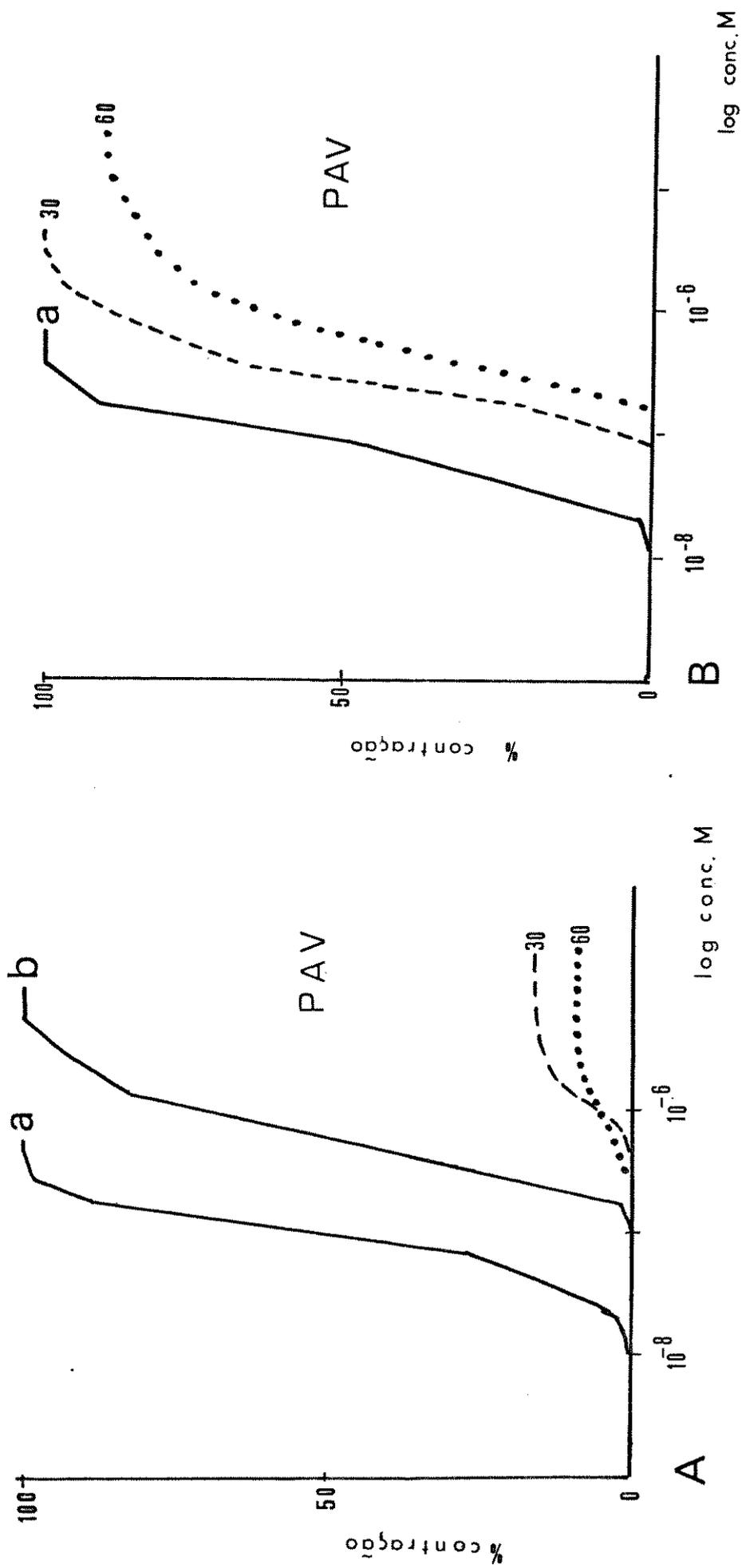


Fig. 20 - Curvas dose-resposta cumulativas ao CBC, em ausência (—) ou após 30 (---) ou 60 (...) minutos de contato com a PAV, ainda na presença de $7,2 \times 10^{-5}$ M e 9×10^{-6} M do alcalóide, respectivamente nos painéis A e B. A curva b foi obtida ao fim do experimento, sem a PAV.

VI. CARACTERÍSTICA DO MÚSCULO TRAQUEAL ISOLADO DA COBAIA

A Figura 21 mostra um experimento típico demonstrativo das características da preparação "cadeia traqueal isolada da cobaia", como se apresenta nas nossas condições experimentais.

Observamos sistematicamente a existência de três níveis de contração. O nível um surge após algum tempo (10-20 minutos) após montagem da preparação na cuba perfusora. Após atingido o máximo nível dessa contração espontânea (SPT) iniciamos uma sequência de estímulos mecânicos com troca verdadeira (vide métodos) ou simulada do líquido nutritivo e observamos sucessivos pequenos acrêscimos da contração até obtenção de novo platô, nível dois. Chamamos de ST à estimulação nessas condições quer partindo do nível zero, máximo relaxamento de que a preparação é capaz, como aparece na segunda e na quarta curvas dessa mesma figura quer partindo do nível um. A contração máxima de que a preparação é capaz define um nível três, representando aqui pela contração ao CBC. A rigor a curva mostrada é sub-maximal. Sua amplitude é de 83 a 90% da máxima, calculados a partir de treze determinações, conforme descrito em métodos. A concentração do CBC no banho para obtenção dessa resposta sub-maximal está em torno de 2×10^{-8} M. A terceira curva da Figura 21 mostra que após obtenção do efeito

sub-maximal ao CBC a supressão deste, por "Krebs" simples, produz relaxamento da preparação, porém, sem exceção, somente até um nível comparável ao nível dois, recém-descrito. A partir daí, o relaxamento adicional só é conseguido com o uso do isoproterenol (IS), usado por nós rotineiramente, ou outros agonistas beta-2 adrenérgicos ou ainda pelo nitroprussiato de sódio, ou ainda pelos alcalóides benzil-isoquinolínicos. Todas essas substâncias relaxantes, uma vez supridas do banho dão condição para que a preparação retome, após alguns minutos novamente o nível um, desde que mantida em condições de quiescência.

A Figura 21 mostra a seguir que o sulfato de atropina, não exerce a menor influência sobre o tono da preparação apesar de ter abolido por completo a resposta ao CBC adicionado subseqüentemente. Já o IS produziu rápido e completo relaxamento, tal como faz a indometacina ($1,3 \times 10^{-6}$ M a $2,6 \times 10^{-6}$ M) cuja velocidade de relaxamento é dose-dependente, e que por seu efeito irreversível sobre o tono intrínseco da preparação, isto é, sobre as respostas ST e SPT, difere fundamentalmente do IS, francamente reversível.

Podemos observar ainda na mesma figura a franca recuperação da resposta ao CBC, isto é a completa reversibilidade do efeito da atropina e a supressão do tono intrínseco, da IDMTC.

Os níveis ST e SPT guardam entre si uma relação quantitativa interessantemente constante. Em seis

experimentos essa relação foi de $2,38 \pm 0,2$.

O tono intrínseco da preparação é função direta também, dentre os limites experimentais, da temperatura. É o que mostra a Figura 22.

A. Efeito da Temperatura

Podemos observar na Figura 22, seis curvas de um mesmo experimento no qual alternamos a temperatura do banho perfusor em 30°C e 40°C . A posição relativa das curvas na abcissa foi alterada para maior clareza de apresentação. Sua geometria e os pontos de estímulo são exatamente os mesmos, no tamanho natural do registro.

Além da visível diferença no tono máximo atingido quando da estimulação mecânica nas marcas em círculo sobre as curvas, podemos constatar, levando em consideração por exemplo as alturas correspondentes à terceira estimulação os valores são de 7 mm, 15 mm e 21 mm a 30°C e de 47, 60 e 65 mm. a 40°C . Existe portanto além da diferença entre a amplitude das curvas, uma aceleração do processo que leva ao desenvolvimento do tono, ao longo do tempo, numa mesma temperatura. Observa-se que o equilíbrio, medido pela horizontalização do traçado, corresponde aproximadamente à décima estimulação para ambas temperaturas. Assim, a enorme diferença apresentada no início tende a se anular com a aproximação do efeito máximo. As duas últimas curvas foram realizadas quatro horas depois das primeiras.

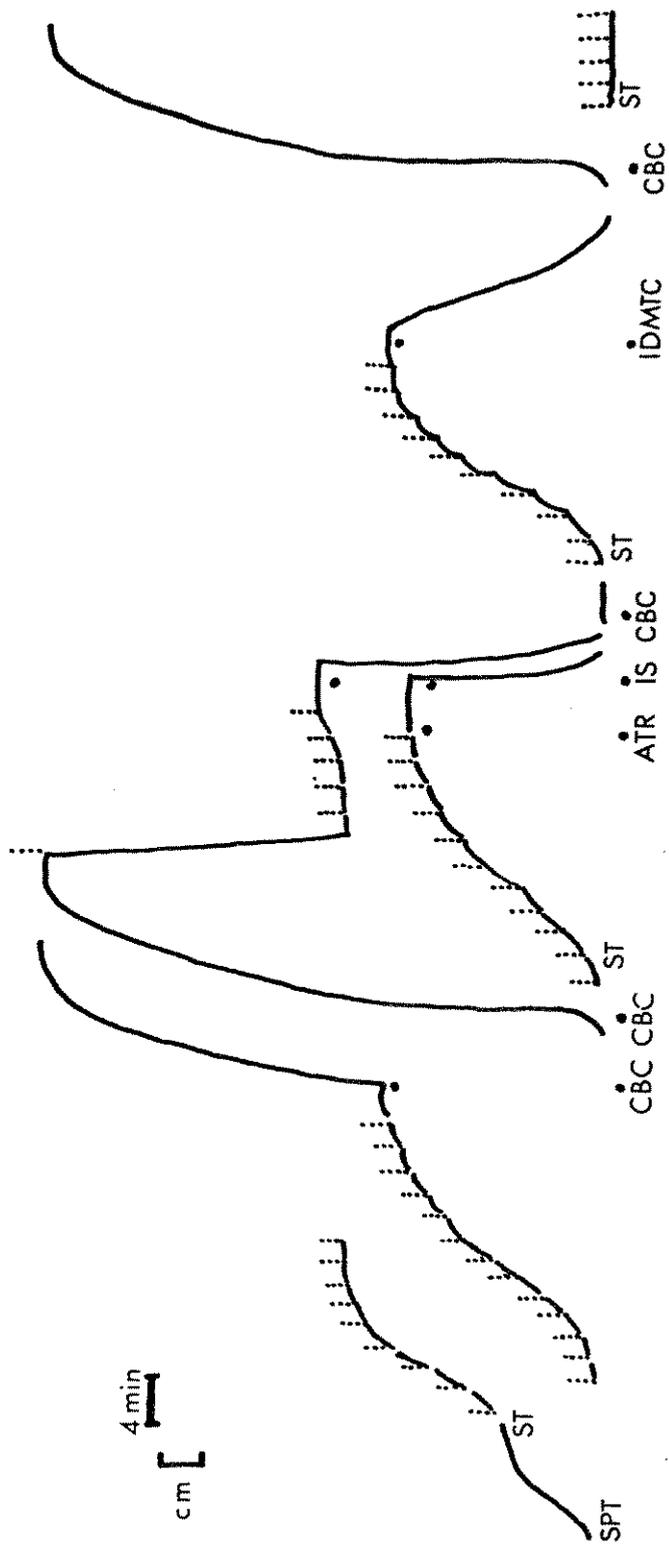


Fig. 21 - Respostas da cadeia traqueal da cobaia a diversas situações: SPT, tono espontâneo; ST, tono sob estimulação mecânica - (barras verticais). Os pontos indicam locais de adição das drogas. Experimento a 30°C. Algumas curvas foram sobrepostas para facilitar a apresentação.

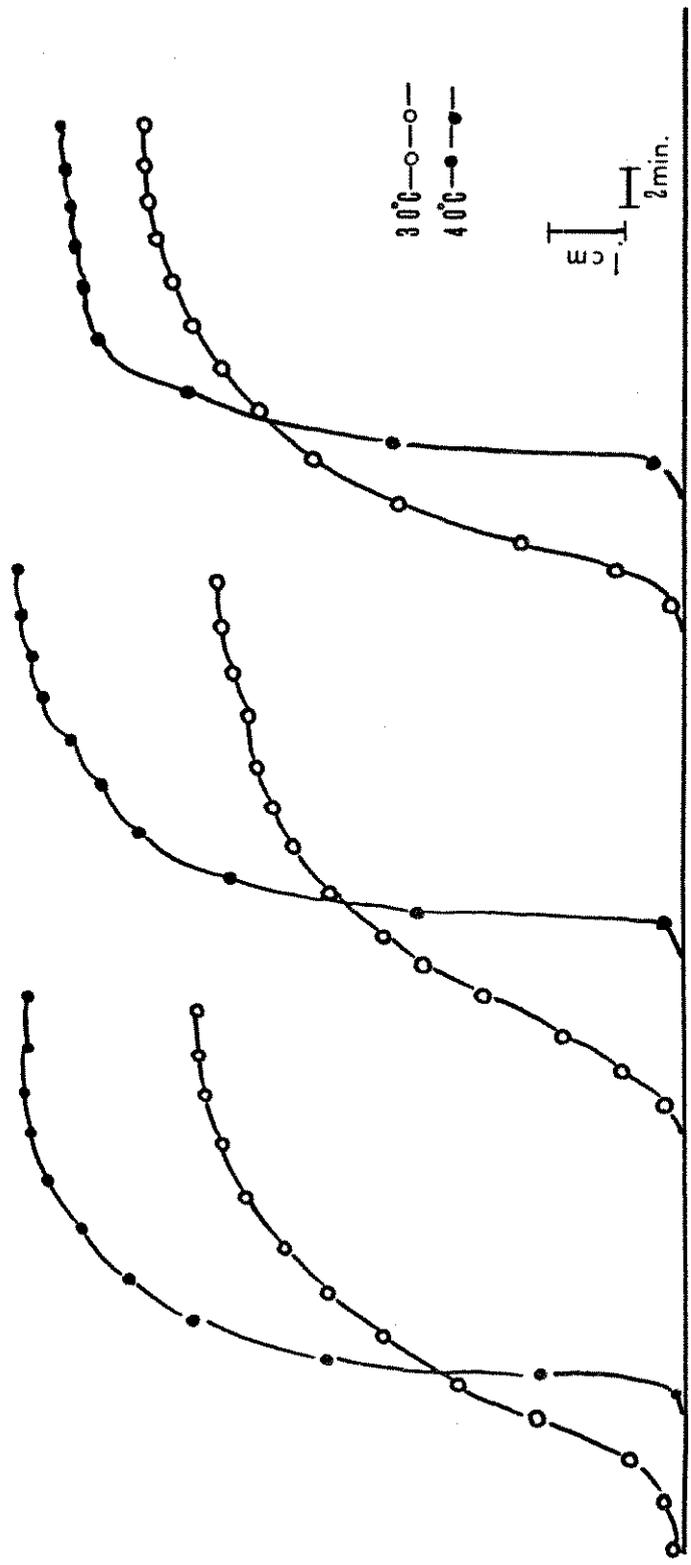


Fig. 22 - Respostas da cadeia traqueal isolada de cobaia, em um mesmo experimento, alternando-se temperaturas de 30 e 40°C. Os círculos mostram os locais onde ocorreu a estimulação mecânica.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Após experimentos preliminares "in vitro" verificamos diferenças na intensidade dos efeitos produzidos pelos alcalóides. Nossa primeira preocupação foi determinar se estas diferenças poderiam ser causadas por propriedades físico-químicas notavelmente diversas entre estas substâncias, potencialmente capazes de influir, mesmo "in vitro", sobre a disponibilidade de cada uma delas na biofase.

Através das fórmulas estruturais apresentadas em "métodos" observamos que são pequenas as diferenças em relação aos pesos moleculares. Do ponto de vista de geometria molecular a maior diferença está representada pelo fechamento do anel correspondente ao grupo metilenodioxido do MMIQ.

Sabemos que um órgão ou um tecido sob perfusão "in vitro" está sob limitada influência dos fatores de transferência e transformação química que são geralmente operativos de modo mais ou menos intenso "in vivo" (Ariens e cols., 1964). Há, entretanto, evidências na literatura de que fatores farmacocinéticos podem operar mesmo "in vitro", configurando situações complexas de distribuição seletiva de drogas, de modo a afetar significativamente resultados experimentais, ou sua interpretação. É, por exemplo, o que demonstram Furchgott e cols. (1973) ao descrever, ainda na preparação traqueal, a e-

xistência de sítios aceptores para o propranolol, cuja afinidade seria 2 a 3 ordens de grandeza inferiores àquela em relação aos beta-receptores, porém em concentração muito mais elevada.

Resultados anteriores mostram claramente que esses alcalóides exercem pelo menos alguns efeitos biológicos importantes sobre enzimas ou estruturas de localização intra-celular. Assim, por exemplo, Vercesi e cols. (1975) demonstraram que o MMIQ produz forte inibição da fosfodiesterase do 3', 5'-AMP_c isolada de cérebro de coelho, a exemplo do que faz a PAV sobre vários sistemas celulares (Kukovetz e Pösch, 1970). A rápida e poderosa inibição produzida pela PAV no consumo de oxigênio de fatias de cérebro de ratos imersas em Krebs - Henseleit suporta a idéia de ação intra-celular, (Meirelles e Vercesi, 1979). Santi e cols. (1964) demonstraram que a inibição intensa que a PAV exerce sobre músculos lisos é semelhante aos da hipóxia, no sentido de que suprime, em determinadas condições, a fase tônica sem alterar significativamente o componente fásico da contração, de modo semelhante aos efeitos provocados pelo 2,4-dinitrofenol, pelo cianeto e outros inibidores metabólicos.

Embora alguns autores, como Berndt e cols. (1976) tenham encontrado estreita correlação entre o efeito miorelaxante, a inibição da fosfodiesterase e o teor de AMP_c em músculo liso tratado pela PAV, pela eupaverina, ou pela etil-papaverina, esse mecanismo está

longe de ter aceitação geral. Takagi e cols. (1958) admitem que a ação relaxante da PAV é intra-celular, enquanto outros autores preferem explicar o processo em função do envolvimento do íon cálcio (Demesy-Waeldele e Stoclet (1971, 1975), Sakai e cols. (1978). Thorens e Haeusler (1979) admitem que a PAV produz relaxamento do músculo liso por inibir o influxo do Ca^{2+} , enquanto que o nitroprussiato de sódio, também "espasmolítico de ação direta" facilita o efluxo de ^{45}Ca , sem entretanto modificar a captação desse íon pela célula (Zsotér e cols., 1977). Percebe-se do exposto que o mecanismo de ação desses agentes permanece desconhecido.

Esses fatos mostram a necessidade sentida por muitos autores de abordar o problema a nível bioquímico para auxiliar a interpretação farmacológica dos fatos ligados à ação de substâncias biologicamente ativas como os alcalóides b. i. q. que caracteristicamente não agem através de receptores.

Como mostram nossos resultados, a análise pura e simples do aspecto das curvas dose-efeito e do seu deslocamento quando em presença de outras substâncias não permite mais do que indicações em determinado sentido. Os fenômenos estudados por nós podem ser considerados adequadamente como antagonismos fisiológicos, embora possam também ser classificados como antagonismo não competitivo. O fato fundamental é a característica inespecificidade de ação desses alcalóides em relação ao agente responsável pela contração por eles antagonizada e a

inexistência de uma ou mais substâncias capazes de bloquear de modo específico sua ação.

Os antagonismos foram estudados contra efeito do carbacol, em razão de ser este o agonista mais ativo sobre a preparação usada, o que permitiria também a utilização das menores concentrações ativas dos alcalóides. Nesse contexto a NO_2PAV é a menos, e a PAV a mais ativa dentre os alcalóides estudados. Seguem, em ordem decrescente DMP, PAV-OH e MMIQ. Os valores dos pK_a obtidos mostram que não há possibilidade de que as diferenças de potência estejam influenciadas por fatores farmacocinéticos "in vitro".

Os experimentos nos quais procedemos a análise simultânea da concentração do alcalóide remanescente no banho e o registro do comportamento do músculo liso permitem obtenção de dados valiosos e interessantes. Assim, dos 10 aos 60 minutos após a adição dos alcalóides à cuba perfusora houve, em todos os casos, decréscimo na quantidade dessas substâncias, detectável espectrofotometricamente, no banho. Se admitirmos que pelo menos a quase totalidade do alcalóide que "desapareceu" do líquido nutritivo se transferiu para a preparação biológica podemos observar que não há correlação aparente entre a quantidade "penetrada" e a intensidade do efeito de relaxamento. Constatamos também que para a mesma quantidade "penetrada" de alcalóide, por exemplo, 30 n moles/10 ml do banho para DMP, PAV e $\text{NO}_2\text{-PAV}$, os relaxamentos aos 10 minutos são diretamente proporcionais à

potência miorelaxante.

O MMIQ e a NO_2 -PAV caracteristicamente penetram de modo mais rápido na preparação e, provavelmente, fazem o mesmo no sentido inverso quando se inverte o gradiente de concentração. Por falta de conhecimento prévio desse fato, e, como a troca do líquido nutritivo é sempre dupla, embora em rápida sucessão, as quantidades de MMIQ e de NO_2 -PAV "penetrada" e recuperada são muito diferentes, indicando perda significativa. Em contraposição, a concordância entre essas quantidades para a PAV e a DMP mostra que não houve perda e que a "penetração" foi de 30 n moles/10 ml para ambas substâncias aos 10 minutos de sua adição ao banho, correspondentes a 55% e 95% de efeito respectivamente. Como aconteceu para todos os alcalóides estudados, dos 10 aos 60 minutos de incubação, aumentou a quantidade transferida para a preparação. Essas quantidades foram, aos 60 minutos de 50, 60, 110, 30 e 120 n moles /10 ml, respectivamente para DMP, PAV, MMIQ, PAV-OH e NO_2 -PAV correspondentes a 100, 100, 91, 87 e 50% de relaxamento. A Tabela 4 permite visualizar o conjunto dos dados nesta análise. Observamos que recuperações completas ocorrem sempre que o efeito miorelaxante máximo não atinge 100% como foram os casos da NO_2 -PAV, da PAV-OH, e do MMIQ (Figuras 10, 11 e 12).

Podemos observar pela mesma tabela, que o PAV-OH chega a produzir 70% do efeito máximo, antes que seja possível detectar redução de sua concentração no

banco perfusor. Dentro de uma margem de erro aceitável para a coleta da amostra, esse fato sugere que mesmo uma quantidade limitada do alcalóide produz o efeito medido, e que o relaxamento não se completa nem mesmo aos 60 minutos, isto é, na concentração de $1,8 \times 10^{-5}$ M o efeito máximo não é atingido. Com a NO_2 -PAV a penetração é rápida e intensa, porém o efeito pequeno e a recuperação do alcalóide no banho indica perda. A PAV tem penetração aparente mais rápida, mas se confirma como muito potente, seguida logo pelo DMP. Admitimos, portanto, considerando os dados das Figuras 8, 9, 10, 11, e 12 que pode se falar em velocidade de penetração aparente, que face a grande semelhança entre as moléculas estudadas, e de seus pK_a s, não permite a correlação com os dados físico-químicos.

Quanto ao efeito residual, nossos resultados concordam com a observação de Rocha e Silva (1950), segundo a qual a velocidade do processo de recuperação da atividade contrátil não depende da natureza do antagonista, mas do grau de inibição produzida por ele, analogia que lembramos, porém sem qualquer implicação de que os fenômenos estudados sejam semelhantes.

Para um mesmo alcalóide, quando as doses foram iguais, a recuperação é tanto mais lenta quanto maior o tempo de incubação (20 ou 40 minutos). Para um mesmo alcalóide e mesmo tempo de incubação, a recuperação é inversamente proporcional à intensidade da inibição produzida.

RELAÇÕES CONCENTRAÇÃO-EFEITO DOS CINCO ALCALÓIDES

RELAXAMENTO % x nmoles no banho	após 10 min.	DMP 30 55%	PAV 30 95%	MMIQ 110 45%	PAV.OH 0 70%	NO ₂ PAV 30 27%
	após 60 min.	50 100%	60 100%	110 91%	30 87%	120 50%
RECUPERAÇÃO % x nmoles no banho		53 71%	63 83%	71 93%	39 100%	32 100%

Tabela 3 - Correspondência entre concentração de alcalóide e atividade muscular nas fases de relaxamento e de contração (recuperação) ao CBC.

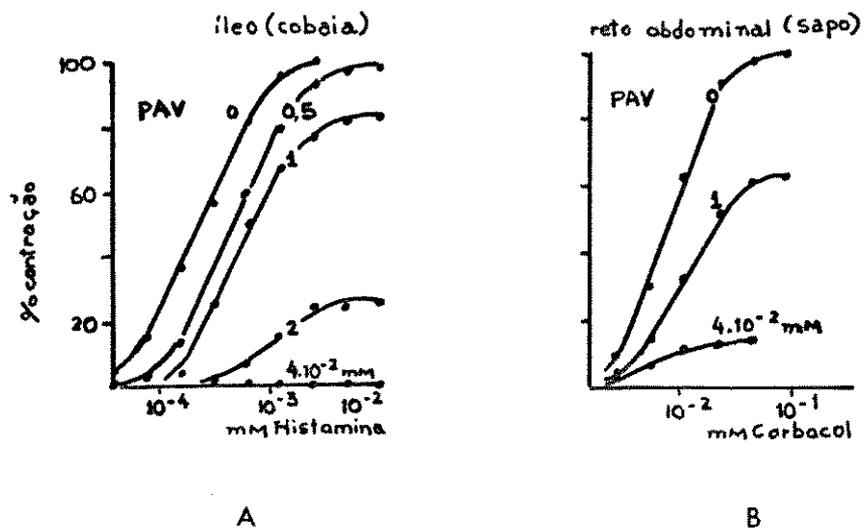


Fig. 23 - Curvas log dose cumulativa - respostas à histamina no íleo isolado da cobaia (painel A) e ao carbacol no músculo reto abdominal de sapo, (painel B) em ausência e em presença de papaverina, nas concentrações indicadas sobre as curvas. (De Ariens e cols., 1964).

A Figura 23, de Ariens e cols. (1964) mostra semelhança com nossa Figura 20 A, ilustrando efeitos produzidos pela PAV em órgãos diversos, em perfusão, chamando a atenção para o deslocamento das curvas que precede o declínio das mesmas, sugerindo, aqueles autores que esse fato seja indicativo da existência de receptores de reserva.

Quanto ao tono intrínseco da preparação, nas condições dos nossos experimentos, convém salientar que inexistente a participação do sistema colinérgico, tal como descrito por Farmer e cols. (1972), como se pode observar pela Figura 21. Verifica-se que não apenas a atropina não exerce qualquer efeito sobre a preparação quando sob condição de tono elevado, como também, ao contrário daqueles autores, a indometacina, em doses pequenas exerce ação seletiva e completa, levando a preparação ao nível zero, como fazem também o isoproterenol e o nitroprussiato de sódio.

É provável que em todos os experimentos em que não usamos inibidores da PG-sintetase, o que foi maioria dentre os realizados para analisar efeitos dos alcalóides benzil-isoquinolínicos, tenha havido síntese de PG quando usamos o CBC, como afirmam Orehek e cols. (1973 e 1975). Esses autores analisaram, por meio de bio-ensaio e também por cromatografia, os produtos secretados quando da contração da traquéia produzida quer pela histamina, quer pela acetilcolina.

Ao longo de nossos experimentos pudemos

constatar que, ao contrário da atropina que produz relaxamento específico da cadeia traqueal previamente contraída pelo CBC só até o nível um, e jamais até o nível zero (linha base), os alcalóides b. i. q. promovem relaxamento completo ou não em função de sua potência espasmolítica, mas não limitado pelo sistema intrínseco prostaglandinérgico modulador do tono. As respostas subsequentes à estimulação mecânica ficam temporariamente , mas nunca irreversivelmente abolidas, fato que concorda com prévia afirmativa de Ferreira e cols. (1972) de que a produção de PG não é afetada pela PAV, em jejuno isolado de coelho.

A diferença fundamental entre esta preparação traqueal e a de jejuno isolado de coelho descrita por Ferreira e cols. (1972) é que nesta após o "período de coleta" de trinta minutos o órgão desenvolve tensão que desaparece quando se substitui o líquido nutritivo. A tensão está portanto condicionada à presença de PGs que se revelaram ser da série E e F. Na cadeia traqueal isolada de cobaia, por razões de compartimentação celular ou por diferenças qualitativas no acoplamento entre excitação e contração, quando se lava a preparação não há absolutamente nenhuma diminuição do tono que, ao contrário, se "acumula" a cada novo estímulo como se vê na Figura 21. Orehek e cols. 1975 realmente demonstraram que este sistema endógeno "prostaglandinérgico" é modulador no sentido centrípeto, isto é, facilita as respostas às pequenas doses de agonistas exógenos espa

mogênicos e se opõe às respostas às grandes doses. Observa-se que na preparação de Foster ligeiramente modificada, pode-se inibir seletivamente o SI (sistema intrínseco) por vários anti-inflamatórios não esterólicos (AINE) (Meirelles e cols, 1979) ou pela quinacrina, conforme preconizado por Vargafitig & Dao (1971) embora, neste último caso o tempo de incubação não possa ser menor que uma hora. O encurtamento ou o aumento da tensão foi proposto também como o responsável pelo "disparo" do SI (Orehek e cols, 1975). Por outro lado constatamos que algumas substancias, notadamente metais pesados inibem seletivamente o funcionamento desse sistema de PG, e que essa inibição pode ser prevenida mas não revertida pela cisteína (Meirelles & Miyasaka, não publicado). Em relação aos agentes miorelaxantes, obtemos, como notável constância e recuperação da capacidade contrátil, quatro minutos após a eliminação do nitroprussiato de sódio (NPR), ambos usados na dose mínima eficaz, que é extremamente constante.

RESUMO E CONCLUSÕES

RESUMO E CONCLUSÕES

1. Os alcalóides benzil-isoquinolínicos estudados previnem ou reverterem as respostas contráteis da cadeia traqueal da cobaia ao CBC.
2. A atividade espasmolítica é, em ordem decrescente : PAV, DMP, PAV-OH, MMIQ e NO₂-PAV.
3. Os pK_as determinados espectrofotometricamente são praticamente iguais, estão em torno de 6,3 ou 6,4 indicando que no pH fisiológico, estão os alcalóides em 91% ou mais, sob forma não dissociada.
4. Os efeitos residuais deixados pelos alcalóides são mais ou menos reversíveis, em função inversa da intensidade do efeito inibitório, e independem de persistência de alcalóide na preparação.
5. O sistema intrínseco modulador do tono atua espontaneamente "in vitro", mas é intensificado pela estimulação mecânica ou pela elevação da temperatura e é inibido reversivelmente pelos alcalóides estudados.

SUMMARY

SUMMARY

The pharmacological effects of five benzyl - isoquinoline alkaloids were studied on the isolated perfused guinea-pig tracheal chain.

The decreasing order of the spasmolytic activity exerted is: papaverine, demethoxy-papaverine, papaverinol, dioxymethverine and nitro-papaverine.

The recovery of the contractile responses to carbachol depends upon the magnitude of the preceding inhibitory effect of each alkaloid and is, in some cases, incomplete.

The pK_a values of the alkaloids, determined spectrophotometrically, are very similar and have probably no significant influence on the spasmolytic activity differences.

Under the defined experimental conditions the tracheal smooth muscle shows a spontaneous development of tone that can be accelerated and increased in strength by elevating the bath temperature or by intermittent mechanical stimulation, and can be specifically and irreversibly inhibited by indomethacin. The benzyl-isoquinoline alkaloids in small doses antagonize, reversibly, the development of tone and the contractions induced by agonist drugs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKÇASU, A. (1959). The physiologic and pharmacologic characteristics of the tracheal muscle. Arch. int. Pharmacodyn. 122: 201-207.
- ARIENS, E.J.; SIMONIS, A.M. & Van ROSSUM, J.M. (1964). Em: Molecular Pharmacology. vol. I, Ariens, E.J. ed., Academic Press, New York.
- AVERY, M.E.; WANG, N.S. & TAEUSCH, H.W.J. (1973) The lung of the newborn infant. Sci. Am. 228: 74-85.
- BAUER, V. & ČÁPEK, R. (1971). Studies on the neuropharmacology of papaverine. The curare-like action isolated of nerve-muscle preparation. Neuropharmacology, 10: 499-506.
- BERNDT, S.F.; SCHULZ, H.U. & STOCK, K. (1976). Influence of papaverine derivatives on phosphodiesterase activity, cyclic 3', 5'-AMP levels and relaxing effect on rabbit ileum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294: 271-275.
- BIGGS, A.I. (1954). A spectrophotometric determination of the dissociation constants of p-nitrophenol and papaverine. Trans. Faraday Soc. 50: 800-802.

- BOZLER, E. (1948). Conduction, automativity and tonus of vis
ceral muscle. *Experientia*, 4: 213-218.
- BURNSTOCK, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.*
24: 509-581.
- BUTTAR, H.S. (1969). Effect of papaverine on potassium and
caffeine-induced contractures on frog skeletal muscle.
Arch. int. Pharmacodyn. 180: 68-80.
- CASTILHO, J. & De BEER, E.J. (1947). The tracheal chain,
a preparation for the study of antipasmodycs with parti-
cular reference to bronchodilator drugs. *J. Pharmacol.*
Expt. Ther. 90: 104-109.
- CARLYLE, R.F. (1964). The responses of the guinea-pig iso-
lated intact trachea to transmural stimulation and the
release of an acetylcholine-like substance under condi-
tions of rest and stimulation. *Brit. J. Pharmacol.* 22:
126-136.
- CARPENEDO, F.; FERRARI, M. & FURLANUT, M. (1968). Effects
of some spasmolytic agents on the lipid-facilitated
transport of calcium ions. *J. Pharm. Pharmac.* 20: 733.
- CHAHL, L.A. & O'DONNELL, S.R. (1971). The effects on some re
ceptors of guinea-pig trachea of a series of sympathomime
tic amines. *Eur. J. Pharmac.* 16: 201-208.

- CHAND, N. & EYRE, P. (1975). Classification and biological distribution of histamine receptor sub-types. *Agents and Actions*, 5: 277-295.
- COBURN, R.F. & TOMITA, T. (1973). Evidence for nonadrenergic inhibitory nerves in the guinea-pig trachealis muscle. *Am. J. Physiol.* 224: 1072-1080.
- COLEMAN, R.A. & FARMER, J.B. (1971). The inducement of tone and its inhibition in isolated tracheal muscle. *J. Pharm. Pharmac.* 23: 220-222.
- COLEMAN, R.A. (1980). Purine antagonists in the identification of adenosine-receptors in guinea-pig trachea and the role of purines in non-adrenergic inhibitory neurotransmission. *Brit. J. Pharmac.* 69: 359-366.
- COLLIER, H.O.J. (1970). Endogenous broncho-active substances and their antagonism. Em: *Advances in Drugs Research*, vol. 5, Harper, W.J. & Simonds, A.B., Academic Press, New York, p. 95-107.
- COMROE, J.H.J. (1976). Funciones especiales en que participa la respiración. Em: *Fisiología de la Respiración*, Interamericana, 2a. ed.

- CONSTANTINE, J.W. (1965). The spirally cut tracheal strip preparation. *J. Pharm. Pharmac.* 17: 384-385.
- DEMESY-WAELDELE, F. & STOCLET, J.C. (1971). On the mechanism of papaverine action on the control of vascular smooth muscle contractile activity by extracellular calcium. *J. Pharm. Pharmac.* 23: 712-713.
- DEMESY-WAELDELE, F. & STOCLET, J.C. (1975). Papaverine, cyclic AMP and the dependence of the rat aorta on extracellular calcium. *Eur. J. Pharmacol.* 31: 185-194.
- DIXON, W.E. & BRODIE, T.G. (1903). Apud NIDDICOMBE, J. G. (1963). Regulation of tracheobronchial smooth muscle. *Physiol. Rev.* 43: 1-37.
- DOUGLAS, W.W. (1980). Em: *The Pharmacological Basis Therapeutics*. Gilman, A.G.; Goodman, L.S. & Gilman, A. eds. The MacMillan Co., New York, 6a. ed., p. 633.
- DRAZEN, J.M.; SCHNEIDER, M.W. & VENUGOPALAN, C.S. (1979). Bronchodilator activity of dimaprit in the guinea-pig "in vitro" and "in vivo". *Eur. J. Pharmacol.* 55: 233 - 239.

- EVERITT, B.J. & CAIRNCROSS, K.D. (1969). Adrenergic receptors in the guinea-pig trachea. *J. Pharm. Pharmac.* 21: 97-102.
- FARMER, J.B.; FARRAR, D.G. & WILSON, J. (1972). The effect of indomethacin on the tracheal smooth muscle of guinea pig. *Brit. J. Pharmacol.* 46: 536P-537P.
- FARMER, J.B. & FARRAR, D.G. (1976). Pharmacological studies with adenine, adenosine and some phosphorylated derivatives on guinea-pig tracheal muscle. *J. Pharm. Pharmac.* 28: 748-752.
- FERRARI, M. & MARAGNO, I. (1970). Effects of rotenone on the electrical and mechanical activity of guinea-pig taenia coli. *Pharmacol. Res. Comm.* 2: 71-76.
- FERRARI, M.; FURLANUT, M. & De PIRRO, R. (1971). Effects of papaverine, eupaverine and isoxuprine on the electrical and mechanical activity of guinea-pig taenia-coli. *Agents and Actions* 2: 50-57.
- FERRARI, M. (1974). Effects of papaverine on smooth muscle and their mechanism. *Pharmacol. Res. Comm.* 6: 97-115.
- FERREIRA, S.H.; HERMAN, A. & VANE, J.R. (1972). Prostaglandin generation maintains the smooth muscle tone of rabbit isolated jejunum. *Brit. J. Pharmacol.* 24: 328-330.

- FERREIRA, S.H. & VANE, J.R. (1974). Aspirin and prostaglandins. Em: The Prostaglandins, vol. 2, Ramwell, P.W. ed., Plenum Press, New York, p. 1-47.
- 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.
- FREDHOLM, B.B.; GUSCHIN, I.; ELWIN, K.; SCHWAB, & G. UVNÄS, B. (1976). Cyclic AMP independent inhibition by papaverine of histamine release induced by compound 48/80. Biochem. Pharmacol. 25: 1583-1588.
- FURCHGOTT, R.F.; JURKIEWICZ, A. & JURKIEWICZ, N.H. (1973). Em: Frontiers in Catecholamine Research. Usdin, E. & Snyder, S.H., eds. Pergamon Press, New York, p.295-299.
- GOMORI, G. (1965). Preparation of buffers for use in enzyme studies. Em: Methods in Enzymology. vol. 1. Colowick, S. & Kaplan, N.O. eds. Acad. Press Inc., New York, p. 138-146.
- GRYGLEWSKI, R. & VANE, J.R. (1972). The release of prostaglandins and rabbit aorta contracting substance (RCS) from rabbit spleen and its antagonism by anti-inflammatory drugs. Brit. J. Pharmac. 45: 37-47.

- GROLLMAN, A. (1951). Em: Pharmacology and Therapeutics. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 106.
- HAWKINS, D.F. & PATON, W.D.M. (1958). Responses of isolated bronchial muscle to ganglionically active drugs. J. Physiol. (Lond.), 144: 193-219.
- 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.
- KOGA, Y.; DOWNES, H. & TAYLOR, S.M. (1980). Direct and indirect actions of dopamine on tracheal smooth muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 315: 15-20.
- KROEGER, E.A. & STEPHENS, N.L. (1975). Effect of tetraethylammonium on tonic airway smooth muscle: initiation of phasic electrical activity. Am. J. Physiol. 228: 633-636.
- KUKOVETZ, W.R. & PÖCH, G. (1970). Inhibition of cyclic-3', 5'-nucleotide-phosphodiesterase as a possible mode of action of papaverine and similarly acting drugs. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 267: 189-194.
- LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; MCAULIFF, J.P.; LUDUEÑA, F.P. & BROWN, T.G. (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. Nature 214: 597-598.

- LAMBLEY, J.E. & SMITH, A.P. (1975). The effects of arachidonic acid, indomethacin and SC-19220 on guinea-pig tracheal muscle tone. *Eur. J. Pharmac.* 30: 148-153.
- MEIRELLES, N.C.; MEIRELLES, U.M.F.; GAVILANES, M.; GÓMEZ - PUYOU, M.T. & GÓMEZ-PUYOU, A. (1978a). Effect of 1- (p-methoxybenzyl)-6,7-methylenedioxyisoquinoline on mitochondrial respiration. *Biochem. Pharmacol.* 27: 1505-1507.
- MEIRELLES, U.M.F.; FONTANA, M.D. & REIS, F.A.M. (1978b). Efeitos da desmetoxi-papaverina sobre o diafragma isolado de ratos. *Ciência e Cultura (Supl.)*. p. 182.
- MEIRELLES, U.M.F.; FONTANA, M.D. & REIS, F.A.M. (1978c). Abstracts do 7º Congresso Internacional de Farmacologia (Paris), p. 845.
- MEIRELLES, U.M.F. & VERCESI, A.E. (1979). Ações neuromusculares de alcalóides benzil-iscquinolínicos. Anais da VIII reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica. Resumo C-3.
- NEWMAN, D.J.; COLELLA, D.F.; SPAINHOUR, C.B. Jr.; BRANN, E.G.; ZABKO-POTAPOVICH, B. & WARDELL, J.R. Jr. (1978). CAMP-phosphodiesterase inhibitors and tracheal smooth muscle relaxation. *Biochem. Pharmacol.* 27: 729-732.

- NICKERSON, M. (1975). Em: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman, L.S. & Gilman, A. eds. The MacMillan Co., 5a. ed. New York. p. 735.
- O'DONNELL, S.R. & WANSTALL, J.C. (1980). Are the pA_2 values of selective β -adrenoceptor antagonists valid when obtained on guinea-pig tracheal preparations contracted with carbachol? J. Pharm. Pharmac. 32: 413-416.
- OKPAKO, D.T.; CHAND, N. & EYRE, P. (1978). The presence of inhibitory histamine H_2 -receptors in guinea-pig tracheobronchial muscle. J. Pharm. Pharmac. 30: 181-182.
- OREHEK, J.; DOUGLAS, J.S.; LEWIS, A.J. & BOUHUYS, A. (1973). Prostaglandins 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. Expt. Ther. 194: 554-563.
- PALL, (1914). Apud SOLLMANN, T. (1949). Em: A manual of Pharmacology. W.B. Saunders & Co., Philadelphia, p. 255.
- PREININGER, V. (1975). Em: The alkaloids, vol. XV. Maske, R.H.F. ed., Acad. Press, New York.

- PUYOU, A.G.; MEIRELLES, N.C. & MEIRELLES, U.M.F. (1977).
Efeito do 1-(p-metoxibenzil)-6,7-metilenodioxiquino-
lina (MMIQ) sobre a transferência de eletrons na ca-
deia respiratória e captação do cálcio por mitocôndria
de fígado de rato. Anais da VIa. Reunião Anual da So-
ciedade Brasileira de Bioquímica, pg. 46.
- ROCHA E SILVA, M. (1950). The mechanism of recovery of
the guinea-pig gut from inhibition by atropine and an-
ti-histaminics. Exptl. Med. Surg. 8: 346-356.
- ROTHSCHILD, A.M.; VUGMAN, I. & ROCHA E SILVA, M. (1961) .
Metabolic studies on the release of histamine of com-
pound 48/80 in the rat diaphragm. Biochem. Pharmacol.
7: 248-255.
- SAKAI, K.; TAKAYANAGI, I.; UCHIDA, M. & TAKAGI, K. (1978)..
Effect of papaverine on Ca²⁺ uptake by a mitochondrial
fraction isolated from rat uterine smooth muscle. Eur.
J. Pharmacol. 50: 131-136.

- SANTI, R.; CONTESSA, A.R. & FERRARI, M. (1963). Spasmolytic effect of the papaverine and inhibition of the oxidative phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 11: 156-159.
- SOLLMANN, T. (1949). *Em: A Manual of Pharmacology.* W. B. Saunders & Co., Philadelphia, p. 255.
- SOUHRADA, J.F. & DICKEY, D.W. (1976). Mechanical activities of trachea as measured "in vitro" and "in vivo". *Resp. Physiol.* 26: 27-40.
- STEPHENS, N.L.; KROEGER, E.A. & KROMER, U. (1975). Induction of a myogenic response in tonic airway smooth muscle by tetraethylammonium. *Am. J. Physiol.* 228: 628-632.
- TAKAGI, K.; TAKAYANAGI, I. & FUJIE, K. (1958), *Chemicopharmacological studies on antispasmodic action.* XV. Non-specific antispasmodic action on tracheal muscle. *Chem. Pharm. Bull.* 6: 716-720.
- TASHIRO, N. & TOMITA, T. (1970). The effects of papaverine on the electrical and mechanical activity of the guinea-pig taenia coli. *Br. J. Pharmac.* 39: 608-618.
- THORENS, S. & HAEUSLER, G. (1979). Effects of some vasodilators on calcium translocation in intact and fractionated vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 54: 79-91.

- TOMIOKA, K. & YAMADA, T. (1982). Effects of histamine H_2 -receptor agonists and antagonists on isolated guinea-pig airway muscles. *Arch. int. Pharmacodyn.* 255: 16-26.
- TRINER, L.; VULLIEMOZ, Y.; SCHWARTZ, I. & NAHAS, G.G. (1970). Cyclic phosphodiesterase activity and the action of papaverine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 40: 64-69.
- TÜRKER, R.K. & ERCAN, Z.S. (1976). The effects of angiotensin I and angiotensin II on the isolated tracheal muscle of the cat. *J. Pharm. Pharmac.* 28: 298-301.
- VERCESI, A.E.; MAGALHÃES, A.F. & MEIRELLES, U.M.F. (1975). The action of 1-(p-methoxybenzyl)-6,7-methylenedioxyisoquinoline, a structural analogue of papaverine, on adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase. *I.R.C. S. Med. Sci.* 3: 492.
- WIDDICOMBE, J.G. (1963). Regulation of intratracheobronchial smooth muscle. *Physiol. Rev.* 43: 1-37.
- ZSOTÉR, T.T.; HENEIR, N.F. & WOLCHINSKY, C. (1977). The effect of sodium nitroprusside on the uptake and efflux of ^{45}Ca from rabbit and rat vessels. *Eur. J. Pharmacol.* 45: 7-12.